



UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE
CUNDINAMARCA
UNICOLMAYOR

*EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA EN DOS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR
PARA EL DIAGNÓSTICO DE SÍFILIS CONGÉNITA.*

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTA D.C 2025



UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE
CUNDINAMARCA
UNICOLMAYOR

***EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA EN DOS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR
PARA EL DIAGNÓSTICO DE SÍFILIS CONGÉNITA.***

ESTUDIANTES

GINO NICOLAS ALGARRA TAVERA

ANGIE JIMENA PÁRAMO CIPAGAUTA

ASESORAS

Ph.D. CLAUDIA ANDREA CRUZ BAQUERO

Ph.D. ADDY CECILIA HELGUERA REPETTO

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTA D.C 2025



UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE
CUNDINAMARCA
UNICOLMAYOR

*EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA EN DOS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR
PARA EL DIAGNÓSTICO DE SÍFILIS CONGÉNITA.*

APROBADA _____

JURADOS _____

ASESORAS. PhD. CLAUDIA ANDREA CRUZ BAQUERO

PhD. ADDY CECILIA HELGUERA REPETTO

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTA D.C 2025

DEDICATORIA

Gino Nicolás Algarra Tavera

A mis padres, pilares fundamentales en mi vida, cuyo aliento constante me impulsó a alcanzar esta meta. Su amor y sacrificio son la base de este éxito. A mi querida familia, gracias por cada palabra de ánimo y por celebrar conmigo cada paso. Y a mi inolvidable Donna, que, aunque ahora estés en el cielo, tu cariño y compañía siempre fueron una fuente de alegría y motivación en este camino. Siempre en mi corazón.

Angie Jimena Páramo Cipagauta

Con profunda gratitud dedico este trabajo a mis padres, su esfuerzo y apoyo inquebrantable hicieron posible este largo camino, desde la distancia siempre sentí su compañía alentadora. A mi hermano, por su fiel compañía y gestos de apoyo, gracias por celebrar cada pequeño avance como si fuera propio, siempre será el mayor ejemplo. Y a cada persona que, con sus palabras de aliento, me impulsaron a continuar. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Queremos manifestar nuestro profundo reconocimiento a las doctoras Claudia Andrea Cruz y Addy Cecilia Helguera, pues su asesoría experta fue un pilar clave en la elaboración de esta tesis. Le damos las gracias, en particular, a la Dra. Cruz por su apoyo continuo y gestión, y a la Dra. Helguera por su valioso compromiso y ayuda.

Nuestro sincero agradecimiento va también para la profesora Andrea Marisol Moreno, cuyo constante acompañamiento y orientación fueron esenciales para el progreso y la culminación de este proyecto. Su presencia fue el soporte principal para la consecución de este logro.

Por último, queremos resaltar y agradecer la gran asistencia ofrecida por Nina Mercedes Rodríguez, auxiliar del laboratorio central. Su disposición para facilitarnos el acceso a equipos y laboratorios, incluso dedicando su tiempo, fue vital para lograr nuestras metas.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	11
Introducción	12
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
1. Antecedentes	15
2. Marco referencial	18
2.1. <i>Treponema pallidum</i>	18
2.1.1. Genoma	19
2.1.2. Inmunología	20
2.1.2.1 Factores de virulencia	20
2.1.2.2. Mecanismos de la inmunidad	21
2.1.2.3. Evasión	21
2.2 Sífilis	22
2.3. Sífilis gestacional	23
2.4. Sífilis congénita	24
2.4.1 Infección neonatal	24
2.4.2. Estadios de la sífilis congénita	24
2.4.2.1 Sífilis congénita temprana	25
2.4.2.2 Sífilis congénita tardía	25
2.4.3 Epidemiología	25
2.4.4 Diagnóstico sífilis congénita	27
2.4.4.1. Pruebas serológicas	27
2.4.4.1.1. Pruebas no treponémicas	28
2.4.4.1.2. Pruebas treponémicas	28
2.4.4.2. Pruebas directas e indirectas	29
2.4.4.3. Pruebas de diagnóstico molecular	29
2.4.4.3.1. Extracción de material genético por columnas de sílice	30

2.4.4.3.2 qPCR sonda TaqMan-----	30
2.4.4.3.2.1. <i>TpN 47</i> -----	31
2.4.4.3.3. qPCR Sybr Green-----	31
2.4.4.3.3.1. <i>polA</i> -----	32
2.4.5. Tratamiento y medidas de prevención-----	32
3. Diseño metodológico -----	34
3.1. Universo, población, muestra-----	34
3.2. Hipótesis, variables, indicadores-----	34
3.3. Técnicas y procedimientos-----	35
3.3.1. Recolección de datos-----	35
3.3.2. Obtención DNA control-----	35
3.3.3. Extracción y cuantificación de DNA-----	36
3.3.4. Evaluación de técnicas qPCR-----	37
3.3.4.1. Sybr Green-----	37
3.3.4.2. Sonda TaqMan-----	37
3.3.5. Detección de <i>Treponema pallidum</i> en muestras clínicas.-----	38
3.3.5.1 Detección del <i>Treponema pallidum</i> qPCR con Sybr Green -----	38
3.3.5.2 Detección del <i>Treponema pallidum</i> qPCR TaqMan -----	38
3.3.6 Análisis de resultados-----	38
3.3.6.1 Curva estándar-----	38
3.3.6.2 Muestras clínicas-----	39
3.3.6.3 Comparación de técnicas-----	39
4. Resultados -----	40
4.1 Resultados serológicos-----	40
4.2 qPCR Sybr Green-----	40
4.2.1 Curva estándar qPCR Sybr Green. -----	40
4.2.2 Especificidad qPCR Sybr Green. -----	42
4.2.3. Resultados muestras qPCR Sybr Green-----	44
4.2.4. Repetitividad qPCR Sybr Green-----	45
4.3. qPCR sonda TaqMan-----	45
4.3.1. Curva estándar qPCR sonda TaqMan -----	45

4.3.2. Acercamiento a la especificidad qPCR sonda TaqMan-----	47
4.3.3. Resultados muestras qPCR sonda TaqMan-----	48
4.3.4. Repetitividad qPCR sonda TaqMan-----	50
4.4. Comparación de técnicas qPCR Sybr Green vs qPCR sonda TaqMan-----	51
4.4.1. Eficiencia, sensibilidad y especificidad analíticas -----	51
4.4.2. Costos y facilidad de montaje -----	52
4.4.3. Análisis estadístico-----	52
5. Discusión-----	54
6. Conclusiones-----	59
7. Referencias bibliográficas-----	61
8. Anexos-----	68

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. <i>Treponema pallidum</i> -----	18
2. Figura 2. Fases clínicas de la sífilis no tratada -----	23
3. Figura 3. Características clínicas de la sífilis congénita -----	25
4. Figura 4. Comportamiento de la notificación sífilis congénita, Colombia, semanas epidemiológicas 01 a 38 2019 - 2024-----	26
5. Figura 5. Incidencia de sífilis congénita por entidad territorial de residencia de la madre, Colombia, semanas epidemiológicas 01 a 38 de 2024 -----	26
6. Figura 6. Resultado de la prueba serológica RPR -----	40
7. Figura 7. Amplificación 10 diluciones seriadas qPCR Sybr Green -----	41
8. Figura 8. Gráfica regresión lineal qPCR Sybr Green -----	42
9. Figura 9. Curva Melt qPCR Sybr Green. Evaluación de diluciones seriadas -----	43
10. Figura 10. Análisis bioinformático especificidad de unión primers polA-----	43
11. Figura 11. Ciclos de amplificación muestras 1-15 Sybr Green -----	44
12. Figura 12. Resultados para PCR Sybr Green -----	44
13. Figura 13. Amplificación 10 diluciones seriadas qPCR sonda TaqMan -----	45
14. Figura 14. Gráfica de regresión lineal para qPCR con sonda TaqMan -----	46
15. Figura 15. Análisis bioinformático especificidad sonda TaqMan y Primers TpN47----	48
16. Figura 16. Ciclos de amplificación de algunas muestras en qPCR sonda TaqMan -----	49
17. Figura 17. Resultados para qPCR sonda TaqMan -----	49
18. Figura 18. Costos reactivos totales por técnicas qPCR Sybr Green / qPCR Sonda TaqMan-----	52
19. Figura 19. Resultados de análisis estadístico T-Wilcoxon-----	53

ÍNDICE DE TABLAS

1. Tabla 1. Genes diana y controles usados en la investigación. -----	35
2. Tabla 2. Diluciones seriadas base 10 por triplicado qPCR Sybr Green -----	41
3. Tabla 3. Diluciones seriadas base 10 por duplicado qPCR sonda TaqMan -----	46
4. Tabla 4. Compilación de resultados serológicos y moleculares para las 30 muestras procesadas -----	50
5. Tabla 5. Comparación de la especificidad, sensibilidad y eficiencia de las dos técnicas moleculares -----	51

RESUMEN

La sífilis congénita (SC) es una infección sistémica causada por la espiroqueta *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*, la cual genera graves complicaciones neonatales, convirtiéndola en un problema de salud pública en Colombia. El diagnóstico se basa en la detección de reaginas mediante pruebas no treponémicas, confirmadas con pruebas treponémicas en caso de reactividad. Sin embargo, estas pruebas presentan una eficacia limitada para diagnosticar la sífilis congénita, ya que poseen baja especificidad y requieren que los títulos en los neonatos sean cuatro veces mayores que los de la madre, con el riesgo de que estos títulos sean resultado del traspaso placentario de anticuerpos maternos.

Con base en este contexto, en este análisis se evaluó la eficiencia y efectividad analítica de dos técnicas de biología molecular (qPCR Sybr Green /qPCR sonda TaqMan) a través de la detección de dos genes específicos de *T. pallidum* (polA y TpN47 respectivamente), mediante el montaje de curvas estándar y el análisis de 30 muestras de neonatos con sospecha de sífilis congénita, se obtuvo una eficiencia de 116.5% para Sybr Green y 168.65% para Sonda TaqMan, así mismo se alcanzó una sensibilidad de 1000 fg/uL y 0.01 fg/uL respectivamente. Los resultados mostraron valores similares en las características técnicas para las dos pruebas, mostrando su potencial en la detección del patógeno en muestras neonatales, sin embargo, la técnica qPCR TaqMan presentó una mayor sensibilidad analítica.

Los resultados de esta investigación son fundamentales para el desarrollo de un protocolo de diagnóstico de sífilis congénita basado en técnicas de biología molecular.

PALABRAS CLAVE: Sífilis congénita, qPCR Sybr Green, qPCR sonda TaqMan, polA, TpN47, eficiencia analítica, efectividad analítica salud pública.

INTRODUCCIÓN

La sífilis congénita (SC), una infección sistémica causada por la espiroqueta *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* (*Treponema pallidum*), es catalogada como un evento de interés en la salud pública de Colombia. Durante el periodo comprendido entre las semanas epidemiológicas 0-38 del año 2024, se notificaron 906 casos de SC, con una incidencia de 2,11 casos por cada 1000 nacimientos (1), esto evidencia un retraso en el cumplimiento de la meta propuesta por la iniciativa ETMI plus (Marco para la eliminación de la transmisión materno-infantil del VIH, la Sífilis, la Hepatitis y la enfermedad de Chagas), la cual busca reducir la incidencia de la SC a 0.5 casos por cada 1000 nacidos vivos para el año 2030. (2).

El diagnóstico de SC en Colombia presenta varios desafíos respecto a sus criterios de confirmación, así pues: se corrobora un caso de SC cuando se cumplen al menos uno de los siguientes criterios: 1. Presencia de un nexo epidemiológico (madre con sífilis durante el embarazo). 2. Resultados de pruebas no treponémicas en el neonato con títulos cuatro veces mayores que los títulos de la madre en el momento del parto. 3. Una o más manifestaciones clínicas sugestivas de sífilis en el neonato. 4. Identificación de *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) por técnicas como microscopía de campo oscuro, inmunofluorescencia entre otros procedimientos técnicos (2). No obstante, existe una escasa disponibilidad de pruebas específicas para el diagnóstico de la sífilis congénita y las técnicas disponibles muestran una eficiencia analítica limitada.

En este contexto, es relevante señalar que las pruebas no treponémicas pueden arrojar resultados falsos positivos debido a la presencia de anticuerpos maternos; además, estas pruebas detectan anticuerpos anticardiolipinas y lecitinas, que no son específicos del *T. pallidum* (3). Aunque las pruebas directas, como la microscopía de campo oscuro y la inmunofluorescencia, posibilitan un diagnóstico inmediato por medio de la visualización de la espiroqueta, su efectividad depende de la presencia de lesiones tempranas, una correcta toma de muestra y la habilidad de un observador

capacitado (4). Así mismo, la utilidad de la presentación clínica de la enfermedad en el diagnóstico es reducida, debido a que la mayoría de los casos de SC son asintomáticos (3). Estas deficiencias en el diagnóstico pueden retrasar el tratamiento oportuno del neonato, lo que a su vez incrementa la probabilidad de la progresión de la enfermedad y un mayor riesgo de desarrollar afecciones crónicas como malformaciones craneofaciales, enfermedades oculares, manifestaciones neurológicas, entre otros problemas de salud (5).

Las pruebas moleculares, como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), se perfilan como una valiosa alternativa para el diagnóstico de la SC, dado que permiten la detección directa del *T. Pallidum* en muestras de neonatos y presentan altos niveles de especificidad, y sensibilidad (6).

Hoy en día, han sido objeto de estudio diversas técnicas moleculares, como la qPCR fundamentada en el uso de dos tipos de marcadores fluorescentes Sybr Green/TaqMan® para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos del patógeno, reportando una alta especificidad analítica y permitiendo su postulación como una importante estrategia para el diagnóstico oportuno de la SC (6,7).

Este trabajo de investigación pretendió resaltar las ventajas que presentan las técnicas moleculares como herramientas diagnósticas en el campo de la SC. Así mismo, pretendió evaluar comparativamente dos métodos moleculares en términos de eficiencia analítica, linealidad, sensibilidad analítica y costo - beneficio, con el interés de postular su integración al diagnóstico de rutina de la SC.

OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar la eficiencia analítica de dos técnicas de diagnóstico molecular para la detección de sífilis congénita en muestras neonatales: la qPCR (Sybr Green), utilizada en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes en la Ciudad de México, y la qPCR (TaqMan®), desarrollada por el semillero REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Objetivos Específicos

- ❖ Implementar un protocolo de extracción de DNA estandarizado en el semillero de investigación REMA, en muestras neonatales.
- ❖ Aplicar dos técnicas de diagnóstico molecular basadas en qPCR para sífilis congénita en muestras neonatales, la primera utilizada en el instituto nacional de perinatología Isidro Espinosa de los Reyes en la ciudad de México para la detección del gen *poIA* y la segunda desarrollada por el semillero REMA de la universidad Colegio Mayor de Cundinamarca para la detección del gen *TpN47*.
- ❖ Evaluar en términos de sensibilidad/especificidad analítica la eficiencia de las técnicas de qPCR aplicadas (Sybr Green/TaqMan®) en muestras neonatales para la detección de sífilis congénita.

1. ANTECEDENTES

Según registros históricos, la aparición de la sífilis se sitúa en Nápoles en 1495 como el primer brote pandémico de la historia; sin embargo, su origen es aún incierto y ampliamente discutido (8). Zafra Anta y García Nieto (2021) en su artículo “Enfermedades pediátricas que han pasado a la historia: Sífilis congénita” sostienen dos hipótesis sobre su aparición desde el continente europeo, la hipótesis colombina expone que la sífilis llegó desde el Nuevo Mundo por los viajes de Cristóbal Colón y su tripulación; la segunda, la hipótesis precolombina plantea que la sífilis se originó en el Viejo Mundo y sólo hasta finales del siglo XV se manifestó. En este mismo reporte, los autores datan el primer caso documentado de SC en 1497 (9,10). Desde entonces, se han recopilado avances en el diagnóstico clínico temprano y diversas opciones de tratamiento evaluados a lo largo de la historia.

La sífilis, también conocida como “la gran imitadora”, es una infección de transmisión sexual y vertical que puede resultar en la muerte fetal o neonatal poco tiempo después del parto. Estos efectos son detallados por Peeling y colaboradores (2017), donde también se aborda el diagnóstico de la SC como un reto importante; en principio este diagnóstico, se basa en criterios como las manifestaciones clínicas del neonato, la microscopía de campo oscuro y la serología (7,11). El estudio también describe, el principal mecanismo de transmisión de la SC, al detectar espiroquetas en la placenta y muestras de sangre de cordón umbilical. Además, destaca que la mayor tasa de muertes neonatales, nacimientos prematuros, baja natalidad e infecciones congénitas se deben predominantemente a pacientes asintomáticos (11).

La Organización mundial de la salud (OMS) expone con gran preocupación indicadores de mortalidad y morbilidad neonatal a causa de la SC catalogándola como la segunda causa principal de muerte fetal prevenible, para el año 2022 se estimaron 700.000 casos de sífilis congénita y 390.000 resultados adversos a nivel mundial (muertes fetales, prematuras, neonatales, nacimientos prematuros y niños con diagnóstico de SC), de estos resultados adversos en el parto el 21% se produjo en mujeres embarazadas que no asistieron a atención prenatal, el 53 % en mujeres que asistieron a controles pero no se les realizó prueba de detección, el 16% y 9% a mujeres

diagnosticadas con sífilis que no recibieron tratamiento o tuvieron tratamiento inadecuado y en mujeres positivas con tratamiento respectivamente (12).

En 2020 se publicó una investigación titulada “Molecular and Direct Detection Tests for *Treponema pallidum* Subspecies *pallidum*: A Review of the Literature, 1964–2017”, en la que realizó una detallada revisión y comparación de algunos métodos diagnósticos para la detección de la SC como la microscopía de campo oscuro, presentando 42% - 86% de sensibilidad y 100% de especificidad, la tinción de Dieterle con 37% - 41% en sensibilidad, así mismo en este análisis se destacan las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos que a pesar de algunas limitaciones, estas técnicas muestran valores prometedores en una gran variedad de muestras; particularmente, en muestras de sangre o suero neonatal (sensibilidad de 67% - 94% y especificidad de 90% - 100%) (7).

Barbosa M y González B (2019), en su tesis titulada “Detección de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* en muestras clínicas para el diagnóstico de sífilis congénita mediante la utilización de variantes de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real” evaluaron la presencia del gen *TpN47* en 27 muestras clínicas, incluidos cuatro sueros de neonatos, mediante PCR convencional, qPCR Sybr Green y qPCR TaqMan®. El estudio mostró alta sensibilidad con qPCR-TaqMan, ya que todas las muestras de suero neonatal fueron positivas con esta técnica, mientras que por qPCR Sybr Green solo una fue positiva. Las autoras sugieren que la sonda TaqMan disminuye los falsos positivos y negativos que se generan en el diagnóstico serológico, no obstante, sugieren disponer de un número mayor de muestras para la validación de la técnica en la clínica (13).

Gladys Pinilla y colaboradores (2015) llevaron a cabo un estudio donde compararon la detección de tres genes diana (*16s ADNr*, *polA* y *TpN47*) para la identificación de *T. pallidum* mediante PCR y dos de sus variantes. Los investigadores concluyeron que los tres genes se detectaron de manera similar usando la PCR convencional; sin embargo, al emplear qPCR con Sybr Green y PCR anidada, la detección del gen *TpN47* mostró una mayor sensibilidad (100%) en comparación con los otros dos genes estudiados. A pesar de ello, los autores señalaron que estos resultados analíticos se basaron en muestras de ADN obtenido a partir de exudados de testículos de conejos infectados con cepa *Nichols*, y que en la práctica clínica estos resultados podrían diferir. Sin embargo, dados

los hallazgos, sugieren que el gen *TpN47* podría ser un buen objetivo diagnóstico para la detección efectiva y eficaz de sífilis congénita (14).

En su investigación, Duran y colaboradores (2019) plantearon la estandarización de una prueba de qPCR para el diagnóstico de *T.pallidum* en muestras de suero de pacientes con sífilis gestacional y congénita. Utilizando una sonda TaqMan, la cual permite amplificar el gen de interés (*TpN47*), se evidenció las capacidades analíticas de la prueba, con un límite de detección de material genético (*T.pallidum*) de 0.113 fg. Además, se obtuvo una especificidad analítica del 100% y una fidelidad del 104% (6). Por su parte, Craig Tipple y su equipo (2011) evaluaron la cinética de la infección por sífilis detectando y cuantificando ADN del gen *Tpp 47* de *T. pallidum* con qPCR Sybr Green. Este estudio incluyó 99 pacientes en diferentes estadios de la enfermedad, allí se reportó una alta especificidad del ensayo al no presentar reacción cruzada con otros microorganismos usados, aunque sensibilidades variables según el tipo de muestra y estadios de la enfermedad; se obtuvo entonces mejores resultados en muestras de úlceras (Sensibilidad = 100% Especificidad = 97,14%) en comparación con muestras de sangre (Sensibilidad= 34,1% Especificidad= 100%) (15).

Yolanda C y Linda G (2023) en su artículo titulado “ Congenital syphilis confirmed by PCR as a result of treatment failure for syphilis in pregnancy. Case report” analizaron un reporte de caso de un neonato con SC post falla de tratamiento convencional con penicilina benzatínica, el cual fue diagnosticado por nexo epidemiológico con su madre, la cual presentaba serología VDRL reactiva, 1 dilución contrastada con la serología del neonato con reactividad de 4 diluciones. En este caso el algoritmo diagnóstico aplicado es el estipulado por el ministerio de protección social de Colombia, el cual excluye las pruebas de biología molecular. Sin embargo, es de resaltar que en el mismo artículo se realizó una prueba de PCR con los remanentes de sueros de muestras sanguíneas tomadas del neonato. Buscando como diana molecular del patógeno el gen *TpN47*, evidenciando positividad de la muestra a partir de una threshold cycle de 19.87, lo que se asociaba a una alta presencia de *T. pallidum* en el neonato. (68)

Todos estos reportes, resaltan la utilidad de la qPCR como herramienta molecular diagnóstica y evidencian avances prometedores en el diagnóstico eficiente de la SC permitiendo así un abordaje efectivo de la enfermedad, así mismo se destaca la necesidad de evaluar y validar la aplicación de

este tipo de técnicas para el diagnóstico de la SC para su inclusión en el algoritmo diagnóstico en Colombia.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 *Treponema pallidum*

Treponema pallidum perteneciente al dominio *Bacteria*, filo *Spirochaetota*, clase *Spirochaetes*, orden *Spirochaetales*, a la familia *Spirochaetaceae* y al género *Treponema* (11,17). En la especie de *Treponema pallidum* podemos encontrar espiroquetas patógenas y no patógenas, entre las más conocidas, asociadas a treponematosi no venéreas o endémicas, podemos encontrar *T. pallidum subespecie pertenue* siendo el agente causal del pian o (Yaws), *T. pallidum subespecie endemicum* agente causal de la sífilis no venérea endémica, *Treponema carateum*, siendo el agente causal de la (pinta; frambesia) y *Treponema pallidum subespecie pallidum* causante de la sífilis venérea (11).

Treponema pallidum es una bacteria gram negativa del tipo espiroqueta, caracterizada por tener forma de espirilo y moverse a través de flagelos por medio de un movimiento ondulante (16). Sus dimensiones son de 10-20 micrómetros de largo y 100-200 nanómetros de diámetro (11), su estructura comprende una membrana externa de peptidoglicano, seguida por el espacio periplásmico que alberga los motores flagelares que dan origen a los endoflagelos o filamentos axiales que rodean la membrana citoplásmica (**Figura 1**), esta membrana confiere estabilidad osmótica y cubre el cilindro protoplásmico, dentro del cual se encuentran los filamentos citoplásmicos (11,17).

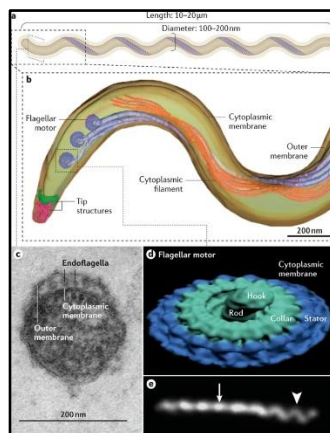


Figura 1. *Treponema pallidum*: A: Medidas *T.pallidum*. B: Estructura morfológica de *Treponema Pallidum*. C: Microscopía electrónica de membrana citoplásmica y endoflagelos. D: Renderizado del motor flagelar, basado en tomografía crioeléctrica. E: Microscopía de campo oscuro de *T.pallidum*

*Tomado de Peeling [11]

2.1.1 Genoma

El genoma de *Treponema pallidum* secuenciado en 1998, constaba de 1.138.006 pb con un porcentaje promedio guanina-citosina de 52,8%, organizadas en un cromosoma circular, con 1.041 ORFs (marcos de lectura abierto) con un tamaño promedio de 1.023 pb representando el 92,9% del ADN genómico total del microorganismo (17). De sus ORFs, a 577 se les asignaron funciones biológicas previstas, 177 ORFs coinciden con proteínas hipotéticas de otras especies y 287 ORFs no tienen bases de datos y representan presuntamente genes nuevos (17).

Desde el punto de vista genético se han caracterizado dos cepas: la cepa Tipo *Nichols*, que presenta una mayor diversidad genética en comparación con la cepa tipo *SS14*. Esta última, ha sido ampliamente utilizada en investigaciones recientes, ya que la mayoría de las cepas contemporáneas pertenecen a esta variante (21,22).

En el año 2013, se llevó a cabo una re-secuenciación del genoma revelando que la cepa tipo *Nichols* contenía 1.139.633 pb y 1.039 ORF, mientras que la cepa tipo *SS14* presentaba 1.139.569 pb y 1.035 ORF. Existen diferencias importantes entre los genomas de estas dos cepas y la heterogeneidad intra-cepa es mayor en la cepa tipo *SS14* respecto a la cepa tipo *Nichols*, posiblemente debido al tiempo transcurrido entre el aislamiento de las cepas secuenciadas, diferencias inherentes a su estructura y regulación del genoma (23).

De acuerdo con su epidemiología molecular, el *T.pallidum* se encuentra dividido en 2 clados: *SS14* y *Nichols*, los cuales a su vez se clasifican en subclados (*SS14* omega, *SS14* east Asia / *Nichols* A, B, C, E, Y). A nivel de su distribución mundial, se encuentra mayoritariamente dispersa la cepa *SS14* con sus subclados. En la región de las américas, se encuentra ampliamente distribuida tanto la cepa *SS14* como la cepa *Nichols* con sus subclados (67).

Adicionalmente, se han descrito varios genes blancos para la identificación de *T. pallidum*, entre ellos el gen *bmp* que codifica para la proteína básica de membrana, el gen *polA* que codifica para la ADN polimerasa I y el gen *Tpp 47* que da lugar a la proteína de membrana de 47 kDa (7).

2.1.2 Inmunología

2.1.2.1 Factores de virulencia

Burgos y colaboradores (2010), describen que los principales factores de virulencia del *T. pallidum* están vinculados con las siguientes propiedades del microorganismo: su habilidad para atravesar diversas mucosas en el hospedero, su tipo de movilidad en forma de “sacacorchos” que le confiere la capacidad de cruzar las capas de tejido y finalmente su habilidad virulenta para atravesar la placenta (18). Se ha reportado que la membrana externa del microorganismo es poco inmunogénica debido a su carencia de lipopolisacáridos, esta escasez de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) permite al *Treponema* evitar la activación de los mecanismos de la inmunidad innata del huésped lo que favorece su replicación local y diseminación temprana, su escasa antigenicidad superficial permite la evasión de la respuesta inmunitaria facilitando su persistencia, sin embargo, la membrana externa de la bacteria cumple un papel importante pues participa en la adherencia a las células del huésped (11) (18).

Por otro lado, su estructura molecular juega un papel importante en la inmunogenicidad del patógeno, expresando predominantemente lipoproteínas ancladas en la membrana citoplasmática, debajo de la superficie de la membrana externa (11). Los factores de virulencia potenciales incluyen una familia de 12 proteínas de membrana y varias hemolisinas (17), pese a esto, se han identificado un número limitado de estas proteínas (Tp0136, Tp0155, Tp0483, TP0435 y Tp0751). Una de las proteínas sugeridas es la *TP0751*, también conocida como pallilysin, es una metaloproteína objetivo primario de los anticuerpos, por lo que se piensa que está expuesta en la superficie del microorganismo, esta proteína posee la capacidad de unirse a las moléculas del huésped que están cerca de vasculatura como la laminina presente en la matriz subendotelial y el fibrinógeno y fibronectina presente en las células endoteliales, permitiendo al *T. pallidum* adherirse eficazmente a la matriz extracelular del huésped (11,19). Por su parte, la *TP0435* también conocida como Cyt Adhesin y Tp17, se expresa parcialmente en la superficie de la membrana externa y actúa como un potente inmunógeno con funciones específicas aún por esclarecer (20).

2.1.2.2 Mecanismos de la inmunidad

Los mecanismos de la inmunidad comienzan con la interacción de la bacteria con receptores celulares específicos del huésped, aunque la membrana externa del *T. pallidum* no cuenta con gran cantidad de lipopolisacáridos, se sabe que cuenta con lipoproteínas tipo adhesinas (*TP0155*, *TP0483*) que interactúan con la matriz extracelular, la fibronectina y la laminina del huésped, facilitando su unión (11)(25).

Posteriormente a través de *MCPs* (Proteínas transmembranales de quimiotaxisceptoras de metilos) y *Che* (Proteínas citoplasmáticas de quimio taxis), el *T.pallidum* comienza su movilización hacia ambientes favorables para su proceso replicativo. Después, ocurre el episodio inflamatorio, en el cual *T. pallidum* induce la expresión de moléculas de adhesión como *ICAM-1*, *VCAM-1* y *E-selectina*, asociado a la interacción con la proteína de 47 KDa *TpN47*. Seguidamente, tiene lugar el proceso de diapédesis de polimorfo nucleares, los cuales fagocitan al patógeno, creando el fagosoma y posterior fagolisosoma el cual contiene radicales libres y péptidos antimicrobianos como las catelicidinas. Diversas células como las dendríticas y macrófagos reconocen los PAMPs del *T. pallidum* (Lipoproteínas, peptidoglicano y lipopolisacáridos) por medio del TLR2 (Receptor tipo toll 2). El reconocimiento por parte de las células dendríticas permite la presentación de antígenos en los nódulos linfáticos, activando la respuesta de los linfocitos productores de *IgM* e *IgG*, a la par se activan múltiples citoquinas, las cuales generan inflamación durante la infección como *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, y *IL-12* (25).

2.1.2.3 Evasión

Inicialmente el *T.pallidum* puede evadir la acción de radicales libres en el fagosoma a través de la enzima *Neelaredoxina*, la cual funciona como una superóxido reductasa (25,31). Otro mecanismo de defensa está asociado al secuestro del hierro (Fe), el cual actúa como cofactor metabólico de *T.pallidum*; además, se ha demostrado que cuenta con proteínas tipo *TroA* y *TroR* (proteína periplásmica de unión al zinc y proteína reguladora de magnesio respectivamente), las cuales

captan estos metales con la capacidad de actuar, como el Fe en su cadena transportadora de electrones. (25, 32, 33).

Un importante mecanismo de evasión de la respuesta inmune adaptativa es la superficie de *T. pallidum*, ya que se ha constatado que los anticuerpos presentan dificultades de unión a él (34). Finalmente, la superficie de *T.pallidum* no es antigénica, limitando una respuesta inmune eficiente frente a la infección del patógeno y favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (25).

2.2 Sífilis

La sífilis es una infección sistémica de transmisión sexual y vertical producida por la espiroqueta *Treponema Pallidum sub. Pallidum* (7, 35) la invasión se da cuando la bacteria logra atravesar las mucosas íntegras o la piel por medio de pequeñas lesiones, posteriormente se empieza a multiplicar hasta generar los primeros síntomas de la sífilis primaria, este periodo de incubación desde el primer contacto con el microorganismo hasta la aparición de síntomas varía entre 10 a 90 días (36).

La sífilis primaria se caracteriza por la aparición de una pápula indolora, que erosiona a un chancro típicamente con bordes duros, no purulento e indoloro (35), esta fase suele estar acompañada de linfadenopatía inguinal unilateral o bilateral (36), finalmente el chancro suele desaparecer entre 3 a 6 semanas; sin embargo, la espiroqueta sigue diseminándose por el organismo a través de la linfa y la sangre (35).

Después la enfermedad entra en la segunda fase también llamada sífilis secundaria o diseminada, en esta etapa es típica la aparición de un brote maculopapular, papular, macular o pustuloso especialmente en las palmas y plantas de forma bilateral, aunque puede presentarse de forma generalizada; también se pueden presentar condilomas planos en zonas húmedas del cuerpo, lesiones en la cavidad oral denominadas “lengua en prado segado” y alopecia en el cuero cabelludo (35,36). Otras manifestaciones como malestar general, fiebre, artralgias, linfadenopatía generalizada, alteraciones renales, hepáticas y gastrointestinales, pueden presentarse (35, 36).

Seguido de la sífilis secundaria, se presenta la fase latente caracterizada por la ausencia de manifestaciones clínicas y presentar una duración desde los 3 hasta incluso 30 años (37): La sífilis

latente se clasifica en dos subtipos según su duración: la sífilis latente temprana, adquirida en los últimos dos años o menos y la sífilis latente tardía, adquirida hace más de 2 años (35).

Finalmente, en ausencia de tratamiento, los pacientes alcanzan la fase terciaria o sífilis terciaria, que se caracteriza por tres manifestaciones distintas. En primer lugar, la sífilis gomosa caracterizada por la aparición de nódulos granulomatosos en piel o en huesos; en segundo lugar, la sífilis cardiovascular que se desarrolla como una endarteritis de la aorta ascendente y finalmente, la invasión al sistema nervioso central o neuro sífilis (35, 36). Todas las fases clínicas de la sífilis no tratada descritas se ilustran en la **Figura 2**.



Figura 2. Fases clínicas de la sífilis no tratada.

* Tomado de Harvey RA [37]

2.3 Sífilis gestacional

Según el Instituto Nacional de Salud (INS) en Colombia, se considera un caso de sífilis gestacional a toda mujer en estado de embarazo, púérpera (periodo desde el nacimiento hasta la normalización del organismo femenino, suele durar de 6 a 8 semanas), o con aborto en los últimos 40 días que presente o no signos sugestivos de sífilis con prueba treponemica o no treponemica reactiva en cualquier título, y que no haya recibido tratamiento para la sífilis durante la gestación o que presenta una reinfección no tratada (38, 39).

La mujer con sífilis gestacional exhibe las mismas manifestaciones clínicas que una persona infectada que no está embarazada (40). Esta situación, combinada con la ausencia de diagnóstico

y tratamiento oportuno, representa un riesgo para que se dé la transmisión transplacentaria de la sífilis al feto, daño o muerte fetales (25). El riesgo de transmisión materno-fetal está relacionado con el estadio de la sífilis de la gestante, es así como la sífilis primaria y secundaria, se asocia con un riesgo de transmisión que oscila entre el 60% a 100% (40), mientras que la sífilis latente temprana y tardía presentan un riesgo del 40% y del 10%, respectivamente (41).

2.4 Sífilis congénita

La sífilis congénita SC es un problema grave que refleja un diagnóstico prenatal limitado y un inadecuado tratamiento a las gestantes a nivel mundial (42). Este panorama, tiene como consecuencia la presentación de una variedad de síntomas en el feto o neonato, las cuales pueden ir desde la ausencia de síntomas hasta manifestaciones clínicas complejas, como daño multiorgánico en pulmones, hígado y los riñones, entre otros (43). Además, puede provocar mortinatos, abortos y nacimientos prematuros.

2.4.1 Infección neonatal

El principal mecanismo de infección neonatal para la sífilis es a través de la vía hematogena - transplacentaria, en la que *T. pallidum* atraviesa la placenta a partir de la novena semana de gestación; sin embargo, la infección también se puede dar por contacto directo de lesiones infectantes durante el parto por el canal vaginal (44). Por su parte, la lactancia no se considera como una vía de infección, siempre y cuando no haya lesiones cutáneas en la areola, pezón o tejido mamario (40).

En la SC, se pueden observar alteraciones en la placenta, como agrandamiento, ensanchamiento, palidez y necrosis (40). Una vez la bacteria se encuentra en la circulación fetal, se disemina por varios órganos, afectando principalmente hígado, huesos, corazón, intestino y bazo (44). Estos órganos son afectados por la extensa respuesta inflamatoria del feto, que se evidencia después de la semana 22 de gestación, tiempo en que el feto ya es capaz de generar una respuesta inmunológica (45).

2.4.2 Estadios de la sífilis congénita

El desarrollo de la SC incluye pacientes asintomáticos (70% de los casos) en su mayoría, muerte fetal (40 % de los casos en embarazos no tratados) y neonatos con diferentes manifestaciones clínicas que pueden presentarse antes o después de los dos años de vida, clasificando así la sífilis congénita en temprana y tardía: (40).

2.4.2.1 Sífilis congénita temprana

En este estadio de la enfermedad, los signos y síntomas se presentan en los dos primeros años de vida, en principio se asocia a prematuridad y en las primeras semanas ausencia de síntomas, posteriormente se evidencia fiebre, anemia, bajo peso, congestión nasal, erupción maculopapular con descamación en palmas y plantas, linfadenopatías, ictericia, hepatomegalia y osteocondritis (Figura 3) (40,45).

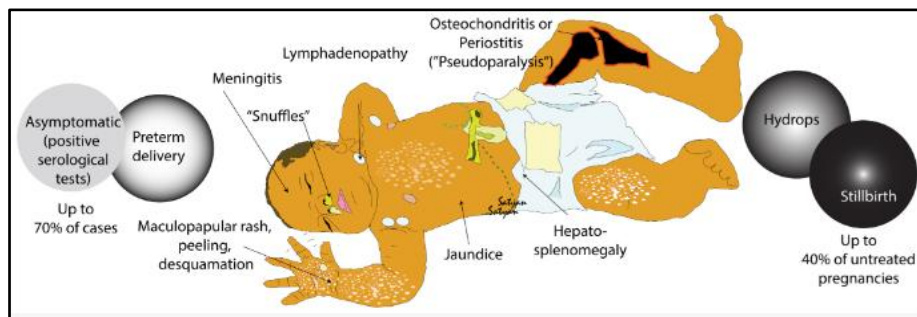


Figura 3. Características clínicas de la sífilis congénita.

*Tomado de Sankaran D [40]

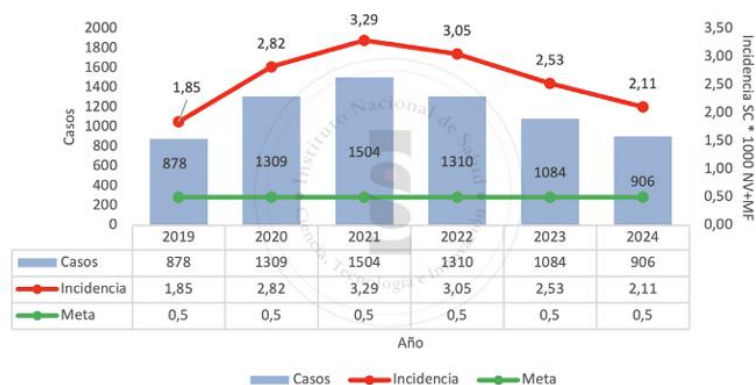
2.4.2.2 Sífilis congénita tardía

Se define como la presentación clínica del bebé posterior a 2 años después del nacimiento, esta puede cursar con defectos como malformación dental “dientes de Hutchinson” a su vez se pueden presentar malformaciones óseas, como periostitis generando “tibias en sable”, destrucción del vómer y malformación del tabique nasal. Se evidencian, además, alteraciones oculares como la queratitis intersticial llegando a causar problemas de ceguera. Así mismo, se ha estudiado la pérdida de audición, asociada al daño del VIII par craneal, compromisos a nivel neuronal, como retrasos y convulsiones. Otras complicaciones, posibles son hepatoesplenomegalia, gomas, infiltrados linfoplasmáticos, entre otros (46).

2.4.3 Epidemiología

Según la OMS en el 2020 se estimaron un total de 7.1 millones de adultos contagiados con sífilis, con un aumento preocupante entre hombres homosexuales y SC; se estimó una tasa de 7 de cada 1000 mujeres embarazadas presentaron sífilis, las cuales se asociaron con un alto número de muertes fetales, neonatales y partos prematuros (48).

En Colombia, según el INS para el año 2024 entre las semanas epidemiológicas 01 a 38, se notificaron 906 casos de SC de procedencia y residencia nacional, con una incidencia de 2,11 casos por cada 1.000 nacidos vivos (1). En la **figura 4** se evidencia el comportamiento de la notificación de los casos de SC en Colombia de las semanas epidemiológicas 01 a 38 desde el año 2019 hasta el 2024, evidenciando un incremento de la incidencia del año 2024 respecto al año 2019.



Fuente: SiviGila, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2024

Figura 4. Comportamiento de la notificación sífilis congénita, Colombia, semanas epidemiológicas 01 a 38 2019 - 2024

* Tomado de Pérez C [1]

Respecto a la meta nacional de reducir los casos de SC, entre las semanas epidemiológicas 01 a 38 de 2024, 37 territorios nacionales no cumplen y 15 tienen una incidencia mayor a la nacional de 2,11, las entidades con mayor incidencia de SC en el periodo descrito fueron Buenaventura, Chocó, Arauca, Cartagena y Casanare de forma descendente (**Figura 5**) (1).

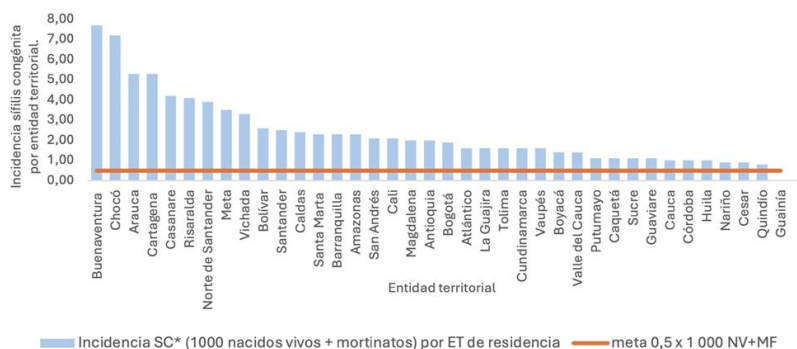


Figura 5. Incidencia de sífilis congénita por entidad territorial de residencia de la madre, Colombia, semanas epidemiológicas 01 a 38 de 2024.

* Tomado de Pérez C [1]

La captación de gestantes diagnosticadas oportunamente con sífilis gestacional en el primer trimestre de gestación aumentó 12 % entre las semanas epidemiológicas 01 y 38 de 2024, en comparación con el mismo periodo de 2023. Al mismo tiempo, se observó una disminución del 16 % en la captación tardía (tercer trimestre) durante el mismo período. Se reportó un ingreso al control prenatal del 77 % (5 858 casos), con un mayor ingreso en el primer trimestre (1).

2.4.4 Diagnóstico sífilis congénita

La Guía de práctica clínica (GPC) basada en la evidencia para la atención integral de la sífilis gestacional y sífilis congénita, define un caso confirmado de sífilis congénita cuando se cumple uno o más de los siguientes criterios (50):

- Producto de la gestación (mortinato o nacido vivo) de madre con sífilis gestacional sin tratamiento o tratamiento inadecuado, sin tener en cuenta el resultado de la prueba no treponémica.
- Producto de la gestación con prueba no treponémica con títulos cuatro veces mayores que los títulos de la madre al momento del parto, lo que equivale a dos diluciones por encima del título materno.
- Todo recién nacido hijo de gestante con sífilis en la gestación, con una o varias manifestaciones clínicas sugestivas de sífilis congénita al examen físico o con paraclínicos sugestivos de sífilis congénita.

- Cualquier resultado de la gestación con demostración de *T. pallidum* mediante las técnicas de campo oscuro, inmunofluorescencia u otra coloración o procedimiento específico a partir de lesiones, secreciones, placenta, cordón umbilical o en material de autopsia.

2.4.4.1 Pruebas serológicas

Estas pruebas se basan en la reacción de antígenos y anticuerpos para la detección de *T.pallidum*. Estas pruebas, se clasifican como treponémicas (FTA-ABS o TPHA) y no treponémicas (VDRL Y RPR) las cuales permiten detectar de forma directa o indirecta al patógeno, no obstante, estas pruebas pueden presentar inespecificidades, dificultades técnicas y experticia de operarios (4).

2.4.4.1.1 Pruebas no treponémicas

Las pruebas no treponémicas, se basan en la detección de anticuerpos anticardiolipinas y lecitinas, estos son componentes celulares liberados tras el daño celular causado por *T.pallidum*. Esta prueba permite detectar anticuerpos clase IgM “infección temprana” e IgG memoria. Dentro de las pruebas no treponémicas se encuentran: el VDRL (Venereal disease research laboratory) un test de micro floculación, basado en la detección de anticuerpos anticardiolipinas y lecitinas; el RPR (Rapid Venereal Disease), un prueba de aglutinación en lámina, el cual detecta anticuerpos anticardiolipinas, sin embargo este utiliza antígenos unidos a partículas de carbono, lo que permite su fijación y visualización (4); y el TRUST (Toluidine Red Unheated Serum Test), el cual se basa en los mismos principios que el VDRL y RPR, sin embargo, este utiliza el rojo de toluidina como agente de visualización. En el contexto del diagnóstico de la SC, estas pruebas tienden a ser inespecíficas, debido a que se identifican anticuerpos no específicos del *T.pallidum*, además se pueden detectar los anticuerpos maternos, como anticuerpos del neonato, generando falsos positivos, así mismo carecen de óptimos niveles de sensibilidad y especificidad en estadios latentes de la enfermedad (4).

2.4.4.1.2 Pruebas treponémicas

Son pruebas que permiten detectar anticuerpos contra *T. pallidum* especialmente de tipo IgG ocasionalmente de tipo IgM a partir de muestras de suero. Este tipo de pruebas, son más sensibles en las primeras etapas de la infección y permanecen positivas indefinidamente por lo que no son útiles para el seguimiento de la enfermedad, la evaluación de tratamiento ni diagnóstico de

reinfección, tampoco permiten la distinción de la infección en razón de las diferentes subespecies de *T. pallidum* (4). Dentro de las pruebas treponémicas más usadas en el diagnóstico de sífilis están: las pruebas rápidas, TPHA (*Treponema pallidum*, Haemagglutination Assay), TPPA (*Treponema pallidum* particle agglutination) y el menos utilizado FTA-ABS (Fluorescent Treponemal antibody absorbed) (39).

Los ensayos TPHA y TPPA se basan en la aglutinación entre las partículas sensibilizadas con el antígeno treponémico y los anticuerpos presentes en el suero del paciente. El TPHA emplea eritrocitos de oveja o ave sensibilizados, diferente al ensayo TPPA, en el cual se usan partículas sensibilizadas, permitiendo reducir las reacciones inespecíficas con el suero (51).

Por otro lado, el FTA-ABS es un ensayo de tinción inmunofluorescente indirecta en el que se exponen los antígenos frente al suero problema, luego se agrega inmunoglobulina antihumana conjugada con FITC (isotiocianato de fluoresceína), un resultado positivo se evidencia por microscopía de fluorescencia (52).

2.4.4.2 Pruebas directas e indirectas

Solo existe una prueba para el aislamiento de *T.pallidum* la cual es RIT (Rabbit Infectivity Test), esta prueba se basa en la inoculación directa de la muestra clínica en los testículos del conejo un medio rico en sustratos para su replicación. Esta prueba presenta múltiples problemáticas éticas, costo-efectivas y solo es utilizada en laboratorios de investigación, por lo cual, no es una prueba óptima de uso rutinario para el diagnóstico de sífilis congénita (4).

También, existen pruebas directas como la microscopía de campo oscuro, basada en la observación de exudados sifilíticos, esta prueba evalúa la forma y movimiento del *T. pallidum*, sin embargo, presenta requerimientos como lesiones con espiroquetemia, tiempo de toma < 20 minutos para analizar motilidad, equipo de microscopia de campo oscuro y observador capacitado en el reconocimiento del patógeno (4,16). Adicionalmente, existen pruebas directas como el DFA-Tp (Direct Fluorescent Antibody for *T. pallidum*), este inmunoensayo utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales para la detección de antígenos propios del *T.pallidum*. Las muestras utilizadas en este ensayo deben ser previamente centrifugadas para asegurar la concentración al

patógeno, así como, también se debe realizar una incubación previa con los anticuerpos en una lámina, requiriendo equipos especiales, el uso de anticuerpos comerciales y la experticia de un observador (4).

2.4.4.3 Pruebas de diagnóstico molecular

Se han descrito pruebas para la amplificación de los ácidos nucleicos del de *T. pallidum*, basados en la PCR, aunque estos métodos no han sido estandarizados y normalizados, han demostrado ser una estrategia de diagnóstico prometedora para SC (51). La PCR y sus variantes se basan en la identificación de genes específicos del genoma de *T. pallidum* (4). Si bien en los últimos años las pruebas moleculares han sobresalido para su implementación en el diagnóstico de sífilis, son pocas las publicaciones en las que estas técnicas se evalúen para el diagnóstico de SC en concreto, por ende, los reportes en muestras neonatales son escasos.

2.2.4.3.1 Extracción de material genético por columnas de sílice

La extracción de material genético de alta calidad es de gran importancia para la optimización de pruebas de biología molecular como qPCR (69). Las cuales pueden ser empleadas para el diagnóstico molecular de sífilis congénita. Este método de extracción se basa en 4 grandes pasos los cuales son la lisis celular, permitiendo la liberación del material genético. Por otro lado, se encuentra el binding, paso en el cual se usa un tampón de sales caotrópicas que al mezclarse con el lisado y transferirse a una columna de sílice, permite la unión del material genético a la membrana de sílice. A continuación, se realizan lavados con tampones con etanol, los cuales permiten remover elementos contaminantes como proteínas, mientras el material genético queda unido a la columna, por último, se realiza una elución con un buffer o agua libre de dnasas con baja fuerza iónica, permitiendo la liberación del material genético de las columnas al eluido (70).

2.4.4.3.2 qPCR sonda TaqMan

Este tipo de PCR es un método de detección específico para el gen TpN47 del *T. pallidum*, en el cual se hace uso de la sonda de cadena específica complementaria al gen, etiquetada con un FAM (Fluoresceína) como donador en el extremo 5' y un "BHQ" (Black Hole Quencher) como aceptor en el extremo 3' (53). Cuando la sonda está intacta el quencher suprime la señal fluorescente del reportero mediante el principio FRET (Transferencia de energía de resonancia fluorescente) en el

que se produce transferencia de energía del reportero al quencher, durante la PCR la Taq polimerasa mediante su actividad de exonucleasa 5´- 3´ rompe la sonda separando el reportero del quencher, por ende, se pierde el principio FRET y se libera la fluorescencia del reportero (54). Este método es altamente específico, ya que la sonda se une a una parte determinada de la secuencia blanco, por ende, si no hay unión de la sonda a su blanco no habrá señal de fluorescencia (53).

2.4.4.3.2.1 *TpN47*

La *TpN47* o también conocida como *Tpp47*, *Tp47* o *47 - Kd lipoprotein*; es uno de los genes blanco utilizado para el diagnóstico molecular del *T. pallidum* (24) (27). El gen se encuentra ubicado en el locus “*P3L05_02980*” entre las posiciones 623733 -624678 con 946 pb y codifica para la lipoproteína de *47-Kd Tp*, la cual se encuentra asociada a la PBPs (proteína de unión a la penicilina) con una constitución de 415 aa, presenta diversos mecanismos funcionales en el patógeno; tales como, la activación de moléculas de adhesión en el huésped y la actuación como una PBPs, lo cual le permite llevar a cabo la síntesis de peptidoglicano para la constitución de su pared celular (25,26).

Duran y colaboradores (2020), desarrollaron una técnica de diagnóstico molecular qPCR basada en una sonda TaqMan para la detección de *TpN47* de *T. pallidum*, la cual obtuvo una eficiencia analítica del 100% con respecto a muestras de suero de pacientes con sífilis gestacional y congénita (6). No obstante, el gen *TpN47* es ampliamente utilizado en el diagnóstico molecular, debido a que no comparte homología con otras espiroquetas e incluso es altamente específico de *T. pallidum* (28).

2.4.4.3.3 qPCR Sybr Green

El Sybr Green usado en la PCR de tiempo real, es una molécula intercalante cargada positivamente que tiene afinidad por el ADN de cadena doble, cuando está en solución sin unirse al ADN no emite fluorescencia; sin embargo, al unirse al surco menor del ADN incrementa hasta 1.000 veces su fluorescencia, la señal emitida se captura en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR (53). En esta

técnica se utilizan primers específicos con el objetivo de flanquear la secuencia blanco *polA*. Esta técnica es un método de detección no específico, debido a que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena incluyendo dímeros de primers; no obstante, es ampliamente usado debido a su bajo costo (53).

2.4.4.3.3.1 *polA*

El gen *polA* está ubicado en el locus “*TPANIC_RS 00515*” entre las posiciones 115817 -118810, este gen codifica para la DNA polimerasa I, una proteína de 997 aminoácidos la cual se encarga de la replicación del material genético de *T.pallidum* (29). Este gen ha sido ampliamente estudiado como un blanco molecular para el diagnóstico de *T. pallidum* debido a varias características: es un gen constitutivo y altamente conservado de este agente patógeno (29) y así mismo posee poca homología con las ADN polimerasa I de otros microorganismos (30).

En la investigación realizada por Pinilla y colaboradores (2015), esta técnica fue evaluada en muestras negativas de sangre de cordón umbilical inoculadas con exudados de testículo de conejo infectados, obteniendo una especificidad del 100 % al evaluarla con otros microorganismos, y 70% de sensibilidad logrando un límite detección de 460 pg (14).

2.4.5 Tratamiento y medidas de prevención

Para los neonatos con sífilis congénita temprana, se administra penicilina cristalina G 50.000 U/Kg intravenosa cada 12 horas durante la primera semana de nacimiento; posteriormente, se le administran 50.000 U/Kg intramuscular 1 vez al día por 10 días. Este primer tratamiento se administra a neonatos que presentan alguna de las siguientes características: A) Anormalidades físicas congruentes con sífilis congénita. B) Pruebas no treponémicas en suero con un título 4 veces mayor al de la madre. C) Prueba de campo oscuro positiva (5). Por su parte, los neonatos con sífilis congénita tardía que no presentan manifestaciones clínicas al momento del parto, con madres con pruebas serológicas reactivas y/o tratamiento para sífilis gestacional, les es suministra una única dosis de penicilina g benzatínica de 50.000 U/Kg (5). Sin embargo, el tratamiento para la sífilis congénita tardía puede ser insuficiente, facilitando que el *T. pallidum* pueda replicarse y llegar a diferentes fluidos incluido el LCR, lo que conducirá a una posible neuro sífilis en el recién nacido (5).

En cuanto a las medidas de prevención, se cuenta con la estrategia ETMI plus (47), la cual se articula con estrategias a nivel mundial y regional. Dentro de estas se encuentran los objetivos de desarrollo sostenible planteados para el 2030, tomando como base el objetivo 3, en el cual uno de sus apartados garantiza el acceso a salud sexual y reproductiva; así como, la educación sexual. Otro de sus apartados busca acabar con enfermedades transmisibles (47). La estrategia ETMI plus, también se articula con la estrategia mundial para la salud de la mujer, el niño y el adolescente 2016-2030, las estrategias mundiales del sector de la salud contra el VIH, las enfermedades de transmisión sexual y las hepatitis víricas 2016-2021, de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el plan de acción para la prevención y el control de las hepatitis virales (2015), de la OPS. Uno de sus principales objetivos es lograr reducir la sífilis congénita a 0.5 casos por 1000 nacidos en las Américas, esto a través de metas programáticas como (47):

- El aumento de cobertura en atención prenatal y de parto en hospitales.
- Aumentar cobertura diagnóstica al 95% en tamizaje para sífilis en embarazadas y misma cifra en tratamiento a las madres gestantes.
- Integración de prácticas para la prevención de la transmisión materno - infantil en hospitales.
- Seguimiento y control riguroso de la madre gestante
- Disposición de elementos diagnósticos fáciles y económicos, así como el uso de tecnologías más robustas para el diagnóstico de la patología.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Universo, población, muestra

UNIVERSO: Neonatos con sospecha de sífilis congénita.

POBLACIÓN: Neonatos con sospecha de sífilis congénita atendidos en la subred sur de la ciudad de Bogotá, Colombia.

MUESTRA: 30 muestras neonatales con sospecha de sífilis congénita, obtenidas en la subred sur de la ciudad de Bogotá Colombia.

SELECCIÓN MUESTRA: Para la selección de las 30 muestras se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión

- Neonatos que hayan sido atendidos al momento de su nacimiento en la subred sur de la ciudad de Bogotá Colombia
- Neonatos con sospecha de sífilis congénita por nexo epidemiológico (Gestantes positivas para pruebas serológicas)
- Pruebas serológicas RPR – VDRL en neonatos.

3.2. Hipótesis, variables, indicadores

HIPÓTESIS NULA: No existen diferencias en la eficiencia analítica de la técnica qPCR Sybr Green y la técnica qPCR TaqMan para la detección de *Treponema pallidum* en el diagnóstico de sífilis congénita en muestras neonatales.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA: Existen diferencias en la eficiencia analítica de la técnica qPCR Sybr Green y la técnica qPCR TaqMan para la detección de *Treponema pallidum* en el diagnóstico de sífilis congénita en muestras neonatales.

HIPÓTESIS DIRECCIONAL: La técnica qPCR TaqMan es más eficiente que la técnica qPCR Sybr Green para la detección de *Treponema pallidum* en el diagnóstico de sífilis congénita en muestras neonatales.

VARIABLES

- **VARIABLE INDEPENDIENTE:** Técnicas de diagnóstico molecular: qPCR TaqMan y qPCR Sybr Green para el diagnóstico de sífilis congénita en muestras neonatales.
- **VARIABLE DEPENDIENTE:** Eficiencia analítica para cada técnica de biología molecular evaluada, incluyendo sensibilidad y especificidad analíticas, como subvariables.

INDICADORES:

- **VARIABLE INDEPENDIENTE:** Técnicas de diagnóstico molecular.
 - Condiciones de reacción (temperatura, tiempo, ciclaje)
 - Concentración de reactivos.
 - Diseño de primers.
- **VARIABLE DEPENDIENTE:** Eficiencia analítica para cada técnica de biología molecular evaluada incluyendo sensibilidad y especificidad analítica como subvariables.
 - La dilución seriada más baja en la que la reproducibilidad, la linealidad y la eficiencia analítica se mantenga en los límites de detección definido.

3.3. Técnicas y procedimientos

3.3.1. Recolección de datos

Las muestras fueron colectadas por convenio interinstitucional entre la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y la Subred Integrada de Servicios de Salud Sur E.S.E de acuerdo con los criterios de inclusión definidos anteriormente. Se compiló información y datos clínicos de las gestantes, tales como nombres, apellidos, documento de identidad, fecha de toma de muestra y resultados de pruebas serológicas de los neonatos.

3.3.2 Obtención DNA control

Tabla 1. Genes diana y controles usados en la investigación.

* Facilitado por el Departamento de Inmunoquímica del Instituto Nacional de Perinatología de México. Para la obtención del DNA control, se realizó un crecimiento de la cepa vector en cultivo BHI con ampicilina por 24 horas (**Anexo 4**), posteriormente se procedió con la extracción del DNA plasmídico por

TÉCNICA	qPCR Sybr Green	qPCR TaqMan
Gen diana	<i>pol A</i>	<i>TpN47</i>
Control positivo	Plásmido PJet1.2 blunt recombinado con el gen <i>POL A</i> en bacterias de tipo <i>Escherichia coli</i> . * Proporcionado por el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes en la Ciudad de México.	Exudado de testículo de conejos infectados con la cepa control Nichols, de la bacteria <i>Treponema pallidum subsp pallidum</i> . Esta muestra fue proporcionada por el Departamento de Inmunopatología de sífilis de la Universidad de Washington Seattle USA.
Control negativo	Control negativo muestras: Muestra paciente negativo para sífilis. Control negativo reactivo NTC: Montaje reactivos sin muestra.	Control negativo muestras: Muestra paciente negativo para sífilis. Control negativo reactivo NTC: Montaje reactivos sin muestra.

medio del protocolo **Extracción de DNA plasmídico** facilitado por el grupo Rema (**Anexo 5**).

3.3.3 Extracción y cuantificación de DNA

Para obtener el DNA de las muestras neonatales, se utilizó el protocolo previamente estandarizado por nuestro semillero de investigación REMA (**anexo 1**) adaptado del kit **DNA Mini Kit Purelink de Thermo Fisher Scientific** apartado “**Blood lysate**” del cual se realizaron las siguientes modificaciones

* La relación muestra con buffer + proteinasa K fue de 1:1 con 200 uL de muestra y 188 uL buffer y 12 uL proteinasa K.

*No se utilizó reactivo RNAsa.

*Incubación a 55° x 30 minutos para activación enzimática.

* Buffer de elución previamente calentado a 55 C°.

*Volumen de elución final 30 uL con doble elución “mismo eluido” lavando la columna.

Posteriormente, las muestras fueron cuantificadas con el **Nanodrop Lite Plus Thermo Scientific**, obteniendo datos de concentración (ng/uL) y relación A260/280, con la finalidad de comprobar la pureza del ADN.

3.3.4 Evaluación de técnicas de qPCR

Equipo utilizado

Las qPCR se llevaron a cabo utilizando el termociclador **Heal Force Real-time Thermal Cycler X960**, equipo proporcionado por facilitado por el Laboratorio central de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

3.3.4.1. Sybr Green

Para la evaluación de la qPCR con Sybr Green se realizó una curva de calibración de 10 puntos con diluciones seriadas (base 10) a partir de DNA plasmídico recombinante del gen *polA* (Concentración de 100 ng/uL). Para la curva de calibración obtenida se evaluó la linealidad por medio del coeficiente de regresión a partir del valor (R²). También se evaluó la eficiencia analítica, límite de detección/sensibilidad analítica y reproducibilidad. La especificidad analítica se evaluó mediante el análisis de la curva melting.

Además, se realizó un análisis bioinformático en el aplicativo PRIMER BLAST NCBI, de los primers usados, para verificar su especificidad de unión a la secuencia blanco, se hicieron pruebas en otros microorganismos como *Leptospira sp* y *Borrelia sp*.

3.3.4.2. TaqMan

Para la evaluación de la qPCR con sonda TaqMan se realizó una curva de calibración de 10 puntos con diluciones seriadas (base 10) a partir de DNA del exudado de testículo de conejo infectado

con la cepa control Nichols, (concentración de 100 ng/uL). Para la curva de calibración obtenida se evaluó la linealidad por medio del coeficiente de regresión a partir del valor (R²). También se realizó una aproximación de evaluación para la especificidad analítica por medio de análisis in silico. Por último, se evaluó el límite de detección y repetibilidad.

Se realizó un análisis bioinformático en el aplicativo PRIMER BLAST NCBI, de los primers y sonda usados, para verificar su especificidad de unión a la secuencia blanco, se hicieron pruebas en otros microorganismos como *Leptospira* sp y *Borrelia* sp.

3.3.5 Detección de *Treponema pallidum* en muestras clínicas

3.3.5.1 Detección del *Treponema pallidum* qPCR con Sybr Green

Una vez evaluada la técnica qPCR Sybr Green, se determinó la presencia de *T. pallidum* siguiendo una adaptación del protocolo facilitado por el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes en la Ciudad de México para la detección de *T. pallidum* por medio de la identificación del gen *poA* (**Anexo 2**), este protocolo fue adaptado de un ensayo multiplex para patógenos del espectro TORCH.

3.3.5.2 Detección del *Treponema pallidum* qPCR TaqMan

Una vez evaluada la técnica qPCR TaqMan se determinó la presencia de *T. pallidum* por medio de la identificación del gen *TpN47*, a partir de la optimización del protocolo diseñado en el laboratorio del grupo REMA para la detección de *Treponema pallidum* (**Anexo 3**), estas mejoras del protocolo se realizaron debido a que durante el desarrollo de la investigación se tuvo que adquirir nuevos reactivos, incluyendo máster mix, sonda y primers, estas nuevas adquisiciones requerían algunas modificaciones en cuanto a temperatura y concentración para su óptimo funcionamiento.

3.3.6 Análisis de resultados

3.3.6.1 Curva estándar

Se evaluaron los dos procedimientos de acuerdo con los siguientes parámetros: la eficiencia analítica de la reacción se estimó mediante la ecuación $E = (10^{-1/b}) - 1 \times 100\%$, la cual debe mantenerse entre 90 % y 110 % (55). La linealidad de las técnicas se evaluó por medio del coeficiente de determinación R^2 el cual proporciona una medida de la variabilidad de los datos experimentales frente a la línea de regresión, el coeficiente de determinación debe ser > 0.980 (56).

La sensibilidad analítica de los ensayos se definió como la dilución seriada más baja en la que no se alteraba la linealidad y repetibilidad (57) y la especificidad analítica para el ensayo qPCR con Sybr Green se analizó mediante la curva melting obtenida en la corrida (58).

3.3.6.2 Muestras clínicas

Los datos obtenidos para cada muestra en cada una de las técnicas se registraron y tabularon con el fin de comparar los resultados tanto en las pruebas serológicas como en las pruebas moleculares.

3.3.6.3 Comparación de técnicas

A partir de la evaluación de las dos técnicas y del análisis de las muestras, se procedió a su comparación considerando criterios como especificidad analítica, sensibilidad analítica, límite de detección, reproducibilidad, costos económicos y facilidad del montaje. Se llevó a cabo un análisis estadístico pareado (test de Wilcoxon) basado en los siguientes criterios: número de muestras $n = 30$, uso de datos no parametrizados y muestra no aleatorizada.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados serológicos

Se obtuvo información de la reactividad serológica de cada muestra correspondiente al resultado de la prueba no treponémica RPR (Rapid Venereal Disease) realizada por la institución de salud (**Figura 6**), contando 16 muestras con reactividad y 14 sin reactividad.

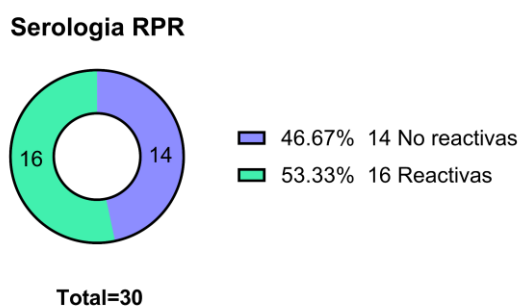


Figura 6. Resultado de la prueba serológica RPR.

Representación gráfica de los resultados de la prueba serológica RPR para las 30 muestras analizadas, realizada por la institución de salud.

Extracción

Los extraídos de cada muestra fueron cuantificados por Nanodrop obteniendo cantidades de ADN desde 2,1 ng/uL hasta 122,5 ng/uL, con relaciones 260/280 en promedio de 1.36, en un rango de 1,08 y 1,54.

4.2 qPCR Sybr Green

4.2.1 Curva estándar qPCR Sybr Green

En la amplificación de las 10 diluciones seriadas con concentración inicial 100 ng/uL, se observó una asociación lineal entre las diluciones a partir de 10^0 hasta 10^{-5} . Con respecto a las diluciones siguientes (10^{-6} a 10^{-10}) se observaron comportamientos oscilantes en el ciclo 30-32 de amplificación como se observa en la **figura 7**, es por esto por lo que se establece como límite de detección de la prueba 1×10^3 fg/uL correspondiente a la dilución 10^{-5} .

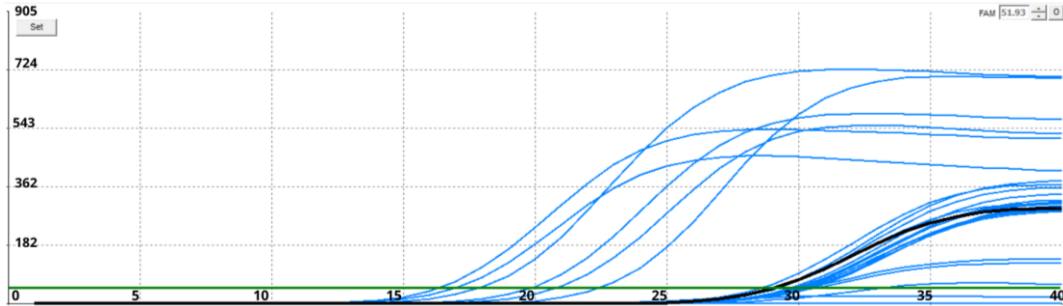


Figura 7. Amplificación 10 diluciones seriadas qPCR Sybr Green. En la gráfica se observan las unidades de fluorescencia (eje Y) vs los ciclos de amplificación /eje x) de cada dilución realizada por duplicado representadas en las líneas azules, en verde se observa el límite de detección (Threshold).

Tabla 2: Diluciones seriadas base 10 por triplicado qPCR Sybr Green

Se presentan los resultados de tres montajes por cada dilución seriada, de las cuales se obtuvieron resultados consistentes hasta la dilución 10^{-5} . Los ciclos con resultado 0,0 no se tuvieron en cuenta para el promedio. Además, se presenta el coeficiente de variación CV para evaluar la repetibilidad de la técnica.

Dilución	Concentración ng/uL	Primer montaje Cq	Segundo montaje Cq	Tercer montaje Cq	Promedio	CV %
10^0	100	15,50	16,20	16,00	15,50	2,27
10^{-1}	9.73	19,53	17,97	16,21	17,90	9,28
10^{-2}	1.5	22,44	20,38	0,00	21,41	6,80
10^{-3}	0.1	27,40	25,29	0,00	26,34	5,66
10^{-4}	0.01	26,42	0,00	28,49	27,45	5,33
10^{-5}	0.001	29,00	30,50	30,65	30,05	3,04
10^{-6}	0.0001	30,56	30,00	31,06	30.54	1,74
10^{-7}	0.00001	0,00	31,00	30,76	30.88	0,55
10^{-8}	0.000001	30,72	32,01	30,66	31.13	2,45
10^{-9}	0.0000001	31,89	31,72	32,12	31,91	0,63
10^{-10}	0.00000001	30,78	30,22	31,67	30,89	2,37

De acuerdo con la información obtenida se construyó la curva estándar con los 5 primeros puntos de las diluciones (**Figura 8**), obteniendo la regresión lineal para el ensayo.

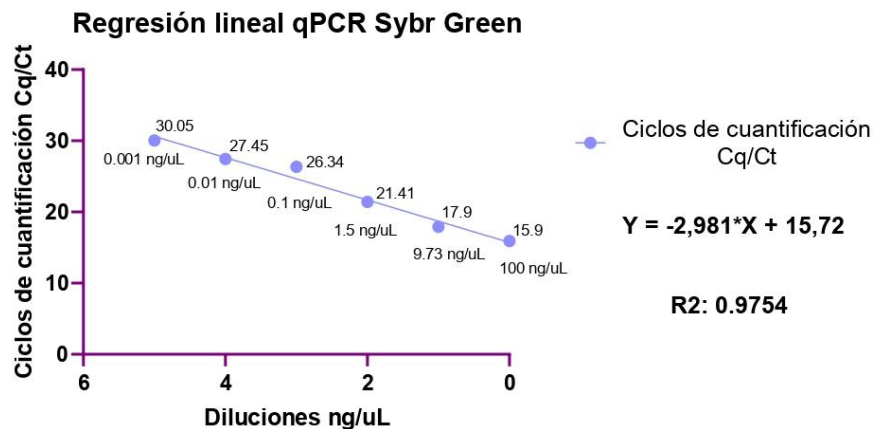


Figura 8. Gráfica regresión lineal qPCR Sybr Green. En el eje X se ubican las diluciones seriadas y en el eje Y se ubican los ciclos de amplificación de la qPCR, para cada punto de la curva se presenta la concentración en ng/uL y el Cq correspondiente. Además, se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación R2.

Para la curva estándar del ensayo de qPCR Sybr Green se obtuvo un coeficiente de correlación R2 de 0.9754 (**Figura 8**), el cual representa una buena linealidad del ensayo, pues está muy cercano al valor de linealidad recomendado (0.980) (56). De acuerdo con los resultados obtenidos, se extrapolan los valores a la fórmula de eficiencia de reacción qPCR en donde:

$$E = (10^{(-1/-2.981)} - 1) * 100 = 116.5\% \quad \text{obteniendo}$$

un resultado de eficiencia analítica de la prueba qPCR Sybr Green fuera de los límites recomendados. (56)

4.2.2. Especificidad Sybr Green

Los resultados demostraron una alta unión intercalante al material genético objetivo, confirmando la selectividad del proceso. Esta conclusión está respaldada por el análisis de una curva de fluorescencia de perfil gaussiano (**Figura 9**), donde las diluciones y muestras positivas mostraron un único pico de amplificación sin que se detectaran señales secundarias como curvas prematuras o residuales asociadas con hibridaciones inespecíficas o artefactos de amplificación. La ausencia de estas interferencias refuerza el rigor metodológico del ensayo y verifica la especificidad analítica del sistema de detección empleado.

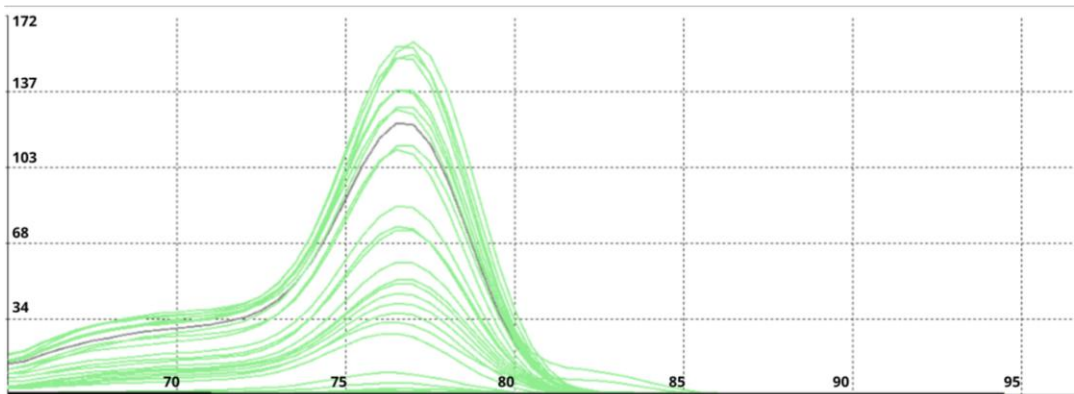


Figura 9. Curva Melt qPCR Sybr Green.

Curva melting para cada reacción de las diluciones seriadas, representada por unidades de fluorescencia vs temperatura.

El análisis bioinformático de los primers usados, demostró la especificidad de unión de estos a la secuencia blanco polA del *Treponema pallidum* (Figura 10).

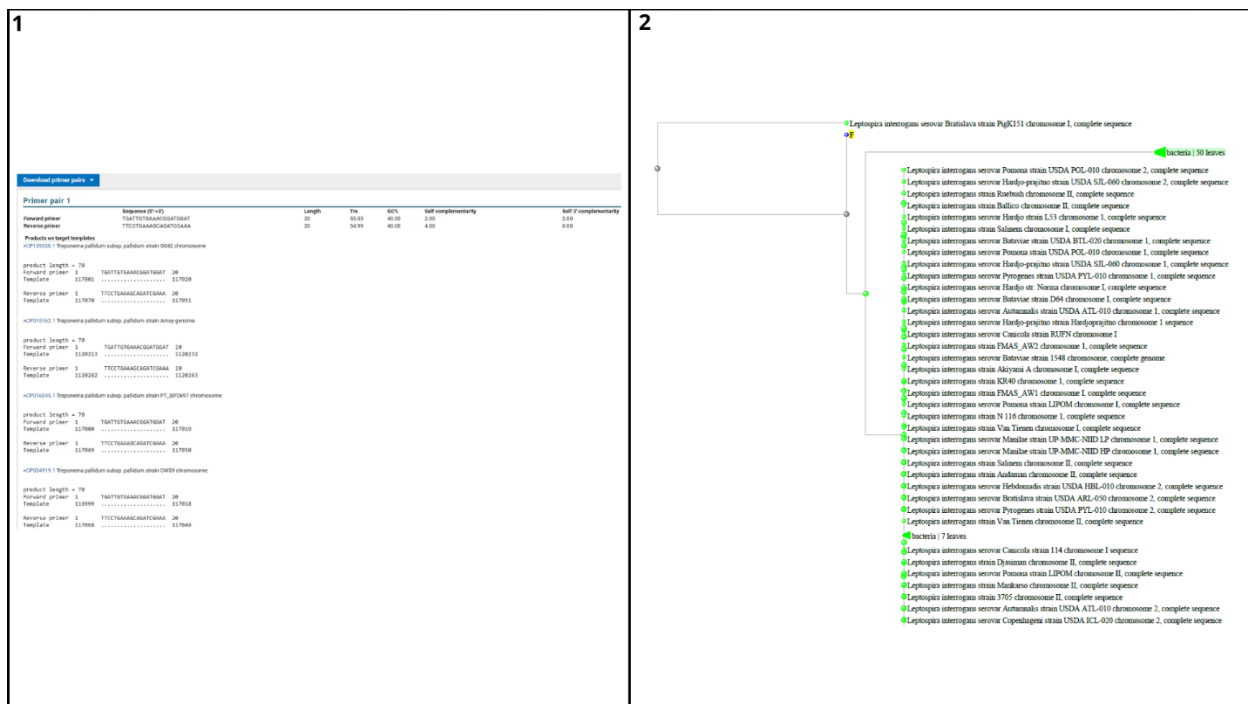


Figura 10. Análisis bioinformático especificidad de unión primers polA
 Análisis in silico realizado en PRIMER BLAST NCBI. (1) Presenta análisis bioinformático primers polA.
 (2) Presenta análisis filogenético con *Leptospira interrogans*.

4.2.3 Resultados muestras Sybr Green

Se procesaron 30 muestras de muestras neonatales, a través de la técnica de biología molecular qPCR Sybr Green entre las cuales se obtuvieron diversos resultados, en la **figura 11** se observa la amplificación de algunas muestras y todos los ciclos de amplificación obtenidos, se observan en la **tabla 4**.

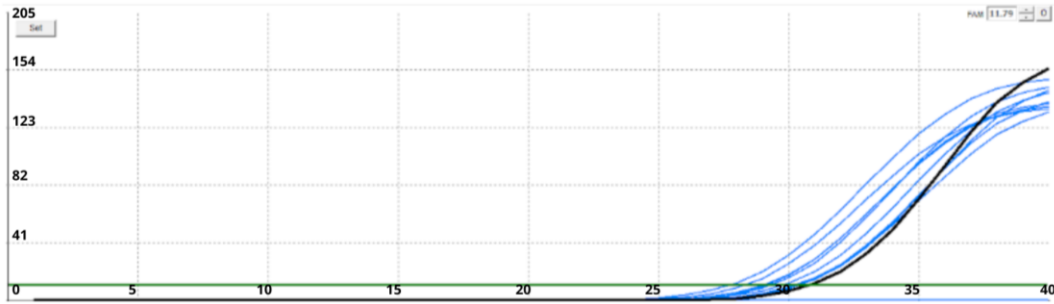


Figura 11. Ciclos de amplificación muestras 1-15 Sybr Green

Se observa la amplificación (líneas azules) de 15 muestras procesadas con qPCR Sybr Green en unidades de fluorescencia (eje Y) vs ciclos de amplificación (eje X).

A partir de la regresión lineal obtenida para la evaluación de la qPCR Sybr Green (**Figura 8**), se definieron los siguientes límites para la interpretación de resultados: muestras con Ct >15 y <30 serán positivas, muestras >30.01 serán negativas (**Tabla 4**). Según estos límites de ciclos de cuantificación definidos, para las 30 muestras procesadas se obtuvieron los resultados de la Figura 12.

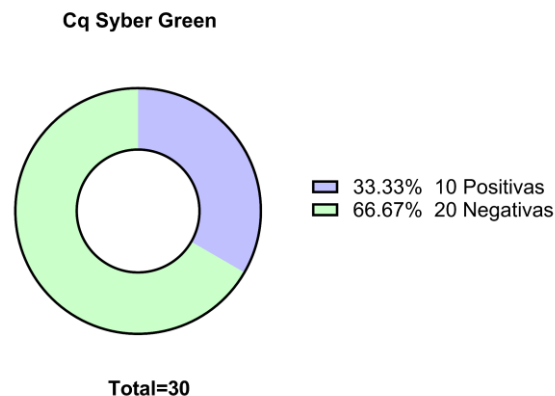


Figura 12. Resultados para qPCR Sybr Green

Representación gráfica de los resultados de acuerdo a los límites establecidos en qPCR Sybr Green para las 30 muestras procesadas, se presentan 10 muestras positivas y 20 negativas.

4.2.4 Repetibilidad qPCR Sybr Green

Se calculó el coeficiente de variación (CV) a partir de los valores de Ct obtenidos en las tres corridas de cada punto de la curva estándar con Sybr Green, obteniendo un CV promedio de 4.01 % para esta técnica (71).

4.3 qPCR sonda TaqMan

4.3.1 Curva estándar qPCR sonda TaqMan

Para la evaluación de la qPCR sonda TaqMan se realizaron 10 diluciones seriadas en base 10, con una concentración inicial de 100 ng/uL. En esta se observó una asociación lineal entre la dilución 10^0 hasta la dilución 10^{-10} (**Figura 13**). Esta curva de evaluación se realizó por duplicado y se promediaron los ciclos de cuantificación obtenidos. De esta manera se establece un límite de detección de la prueba equivalente a 0.01 fg/uL.

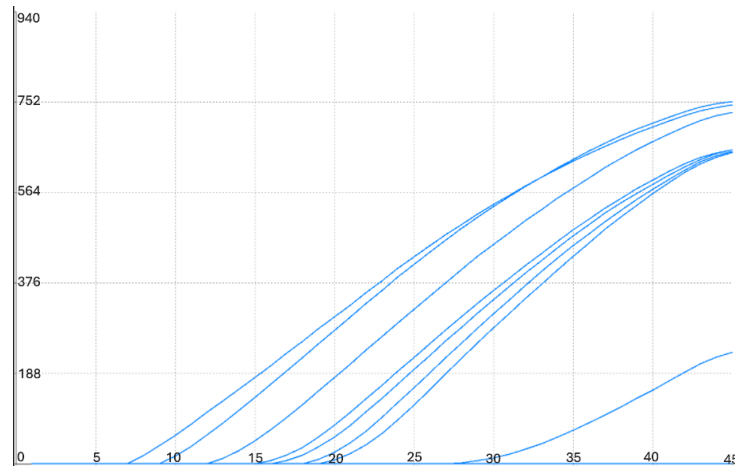


Figura 13. Amplificación 10 diluciones seriadas qPCR Sonda TaqMan

En la gráfica se observan las unidades de fluorescencia (eje Y) vs los ciclos de amplificación /eje x) de cada dilución realizada por duplicado representadas en las líneas azules, en verde se observa el límite de detección (Threshold).

Tabla 3. Diluciones seriadas base 10 con Cq por duplicado qPCR sonda TaqMan

Se presentan los resultados de dos montajes por cada dilución seriada, de las cuales se obtuvieron resultados consistentes hasta la dilución 10^{-10} . Además, se presenta el coeficiente de variación CV para evaluar la repetibilidad de la técnica.

Dilución	Concentración ng/uL	Primer montaje Cq	Segundo Montaje Cq	Promedio	CV %
10^{-0}	100	9,50	10,50	10,00	7,07
10^{-1}	9.7	10,00	11,60	10,80	10,48
10^{-2}	1.65	11,30	13,10	12,20	10,43
10^{-3}	0.7	15,75	13,25	14,50	12,19
10^{-4}	0.01	16,05	17,95	17,00	7,90
10^{-5}	0.001	18,50	23,90	21,20	18,01
10^{-6}	0.0001	24,10	22,50	23,30	4,86
10^{-7}	0.00001	24,50	25,30	24,90	2,27
10^{-8}	0.000001	28,25	26,15	27,20	5,46
10^{-9}	0.0000001	28,35	30,85	29,60	5,97
10^{-10}	0.00000001	31,50	32,30	31,90	1,77

Con base en la información obtenida se construyó una curva estándar con los diez puntos de dilución, obteniendo la regresión lineal del ensayo (**Figura 14**).

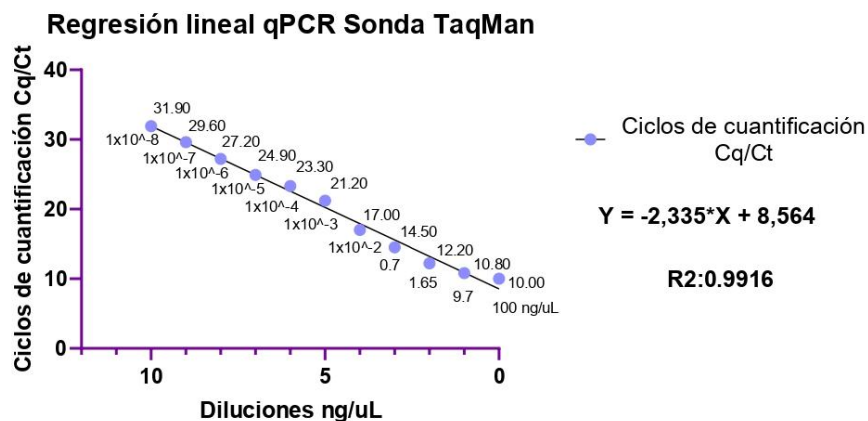


Figura 14. Gráfica de regresión lineal para qPCR con sonda TaqMan

En el eje X se ubican las diluciones seriadas y en el eje Y se representan los ciclos de cuantificación Cq, para cada punto de la curva se presenta la concentración en ng/uL y el Cq correspondiente. Además, se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación R2.

Al realizar la curva estándar del ensayo qPCR con sonda TaqMan se obtuvo un coeficiente de correlación R2 de 0.9916 (**Figura 14**), el cual, según los valores establecidos, representa una buena linealidad del ensayo (56). Para la regresión lineal en cuestión se obtuvo una pendiente de -2.33 la cual fue reemplazada en la siguiente fórmula para hallar la eficiencia de la reacción:

$E = (10^{(-1/-2.33)} - 1) * 100 = 168.65 \%$ obteniendo un resultado de eficiencia analítica de la prueba qPCR sonda TaqMan superior al 100%.

4.3.2. Acercamiento a la especificidad qPCR sonda TaqMan

Se planteo una propuesta metodológica para la aproximación de la evaluación de la especificidad analítica en los primers y sonda TaqMan por medio del ensayo in silico el cual se realizó para verificar la fidelidad de unión de los primers y la sonda, (**Figura 15**) este arrojó resultados óptimos, demostrando que los oligonucleótidos usados en el ensayo son específicos para la secuencia de *Treponema pallidum* y no son complementarios a secuencias de otros microorganismos (*Borrelia burgdorferi*, *Leptospira interrogans*) evitando las amplificaciones inespecíficas. Por otro lado, se comprobó la especificidad de unión asociada al fundamento de la técnica, ya que sin la secuencia blanco del patógeno TpN47 no se hibridaría la sonda y por ende no se reportaría fluorescencia en la reacción.

El análisis filogenético realizado con los microorganismos nos permite evidenciar que los oligonucleótidos diseñados presentan alta especificidad para *T.pallidum*, pese a que presente ancestría marcada con *Borrelia burgdorferi*.

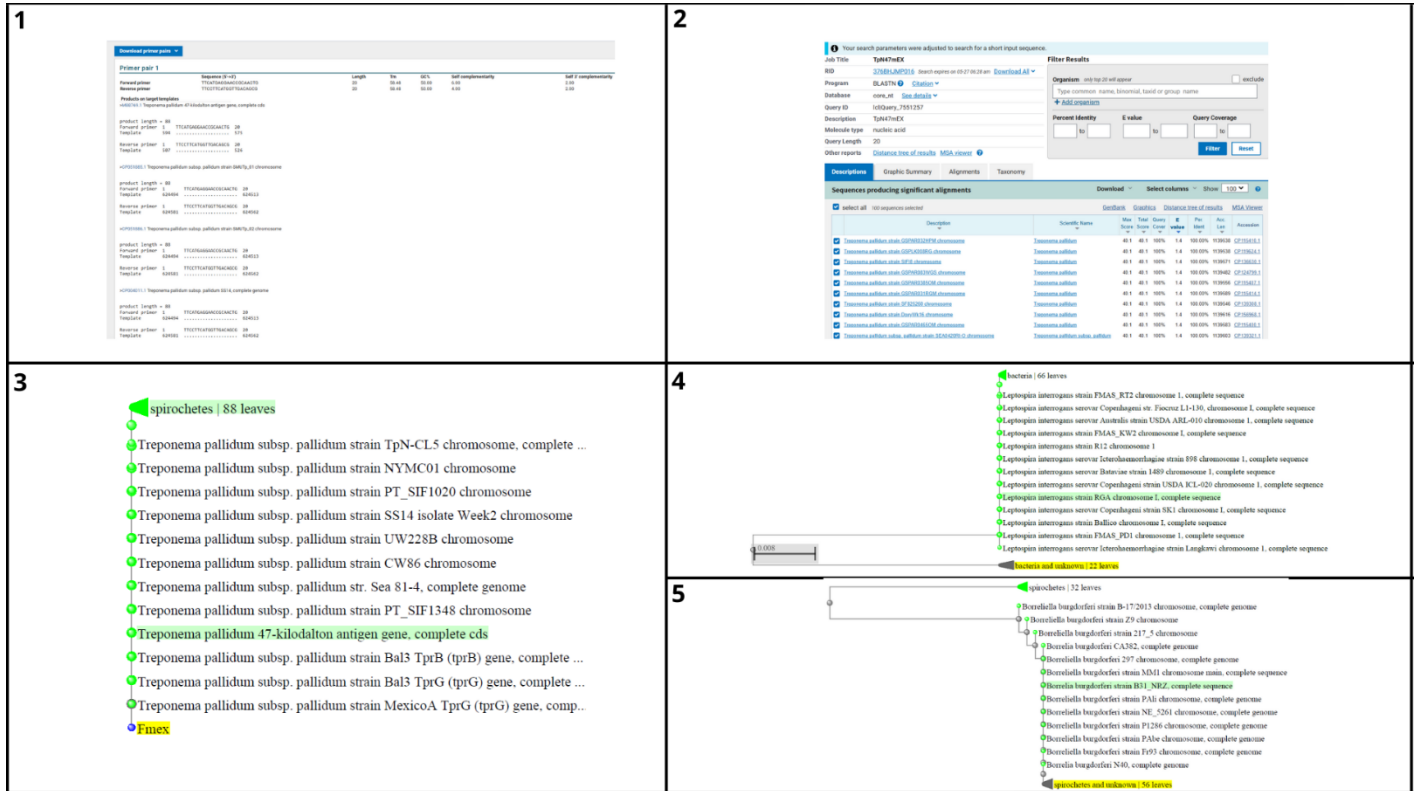


Figura 15. Análisis bioinformático aproximación especificidad sonda TaqMan y Primers TpN47
 Análisis in silico realizado en PRIMER BLAST NCBI. En la imagen (1) se encuentra el análisis de los primers. (2) presenta en análisis de la sonda. (3) presenta análisis filogenético primers. (4) presenta análisis filogenético sonda con *Leptospira interrogans*. (5) presenta análisis filogenético primers con *Borrelia burgdorferi*.

4.3.3. Resultados de muestras con qPCR sonda TaqMan

Se procesaron 30 muestras neonatales, a través de la técnica de biología molecular qPCR sonda TaqMan entre las cuales se obtuvieron diversos resultados basados en los ciclos de amplificación, algunos de estos mostrados en la **figura 16**, los ciclos de amplificación obtenidos para las 30 muestras se observan en la **tabla 4**.

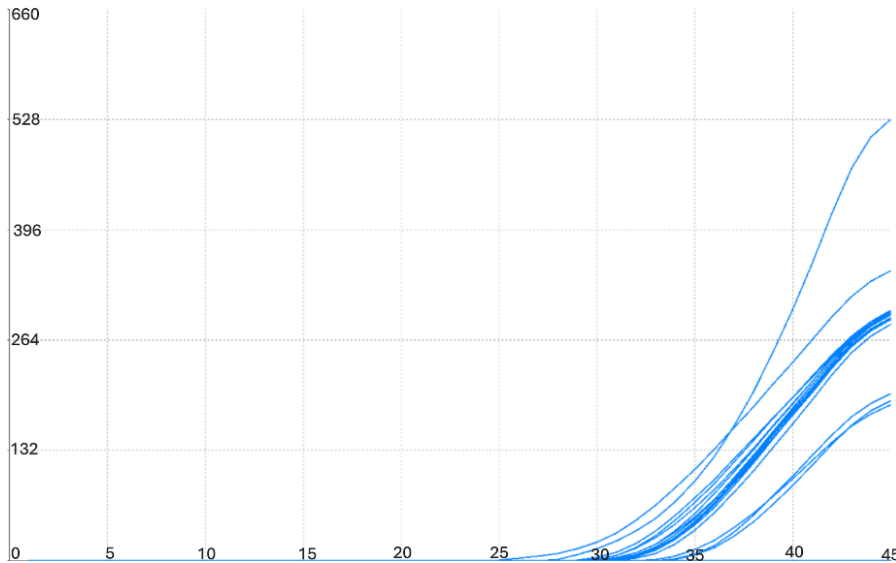


Figura 16. Ciclos de amplificación de 30 muestras en qPCR sonda TaqMan

Se observa la amplificación (líneas azules) de las muestras procesadas con qPCR sonda TaqMan en unidades de fluorescencia (eje Y) vs ciclos de amplificación (eje X).

De acuerdo con la regresión lineal obtenida para el ensayo (**Figura 14**) para la evaluación de la qPCR con sonda TaqMan, se establecen los siguientes límites para la interpretación de resultados: muestras con $Ct > 9.0$ y < 32.0 serán positivas y muestras con $Ct > 32$ serán negativas. Con base a estos límites de ciclos de cuantificación definidos, para las 30 muestras se obtuvieron los siguientes resultados observados en la **Figura 17**.

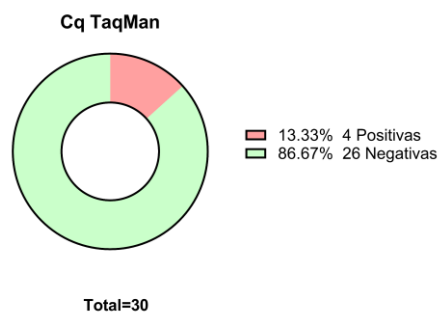


Figura 17. Resultados para qPCR sonda TaqMan

Representación gráfica de los resultados de acuerdo con los límites establecidos en qPCR sonda TaqMan para las 30 muestras procesadas, se presentan 4 muestras positivas y 26 negativas.

4.3.4 Repetibilidad qPCR sonda TaqMan

Se calculó el coeficiente de variación (CV) a partir de los valores de Ct obtenidos en las dos corridas para cada punto de la curva estándar procesadas con sonda TaqMan, obteniendo un CV promedio de 8,64 % para esta técnica.

Tabla 4. Compilación de resultados serológicos y moleculares para las 30 muestras procesadas

* Muestras caracterizadas como negativas, pero con estricto seguimiento por obtener ct cercanos al límite cut-off

MUESTRA (N°)	SEROLOGÍA RPR	qPCR Sybr Green (ct)	Resultado qPCR Sybr Green	qPCR SONDA TaqMan (ct)	Resultado qPCR SONDA TaqMan (ct)
1	Reactiva 2 dils	30.88	Negativa*	32.5	Negativa*
2	No reactiva	29.27	Positiva	33.47	Negativa
3	No reactiva	27.73	Positiva	26.57	Positiva
4	No reactiva	30.30	Negativa*	0.00	Negativa
5	-----	29.64	Positiva	33.28	Negativa*
6	Reactiva 16 dils	28.83	Positiva	30.23	Positiva
7	Reactiva 8 dils	28.16	Positiva	0.00	Negativa
8	No reactiva	0.00	Negativa	33.48	Negativa*
9	No reactiva	30.12	Negativa*	0.00	Negativa
10	Reactiva 2 dils	30.10	Negativa*	0.00	Negativa
11	Reactiva 16 dils	31.44	Negativa*	0.00	Negativa
12	Reactiva 1 dils	29.00	Positiva	35.60	Negativa
13	No reactiva	30.05	Negativa*	0.00	Negativa
14	No reactiva	29.19	Positiva	0.00	Negativa
15	No reactiva	32.62	Negativa	33.98	Negativa*
16	Reactiva 8 dils	0.00	Negativa	30.19	Positiva
17	Reactiva 2 dils	31.72	Negativa*	0.00	Negativa
18	Reactiva 4 dils	31.02	Negativa*	0.00	Negativa
19	Reactiva 2 dils	0.00	Negativa	0.00	Negativa

20	Reactiva 2 dils	31.13	Negativa*	33.52	Negativa*
21	No reactiva	29.37	Positiva	33.25	Negativa*
22	No reactiva	31.55	Negativa*	33.60	Negativa*
23	No reactiva	0.00	Negativa	33.08	Negativa*
24	No reactiva	0.00	Negativa	0.00	Negativa
25	No reactiva	0.00	Negativa	0.00	Negativa
26	No reactiva	32.81	Negativa	34.98	Negativa
27	Reactiva 2 dils	29.34	Positiva	32.47	Negativa*
28	Reactiva 2 dils	29.06	Positiva	32.12	Negativa*
29	Reactiva 8 dils	0.00	Negativa	31.99	Positiva
30	Reactiva 2 dils	30.03	Negativa*	35.72	Negativa

4.4 Comparación de técnicas qPCR Sybr Green vs qPCR sonda TaqMan

4.4.1 Eficiencia, sensibilidad y especificidad analíticas

De acuerdo con las evaluaciones realizadas para cada técnica se presenta un comparativo (Tabla 5) para los puntos definidos a evaluar.

Tabla 5.

Comparación de la especificidad, sensibilidad y eficiencia de las dos técnicas moleculares

	qPCR Sybr Green	qPCR SONDA TaqMan
ESPECIFICIDAD ANALITICA	Valorada por curva melting y análisis in silico con resultados favorables	Valorada por análisis in silico con resultados favorables.
SENSIBILIDAD ANALITICA	1 x 10 ³ fg/uL → 1000 fg/uL	0.01 fg/uL.
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN R2	0.9754	0.9916
EFICIENCIA ANALITICA	116.5%	168.65 %
COEFICIENTE DE VARIACIÓN CV	4.01 %	8.64 %

4.4.2 Costos y facilidad del montaje

SONDA TAQMAN		SYBR GREEN	
M. mix	\$1.875.000	M.mix	\$1.875.000
Primer Forward	\$424.600	Primer Forward	\$424.600
Primer Reverse	\$424.600	Primer Reverse	\$424.600
Sonda	\$780.000	H2O	\$108.629
H2O	\$108.629		
TOTAL	\$3.612.829	TOTAL	\$2.832.829

Figura 18. Costos reactivos totales por técnicas qPCR Sybr Green / qPCR Sonda TaqMan

Estimación del costo de cada prueba de acuerdo con los reactivos usados en la presente investigación.

Conforme a los protocolos establecidos y a los reactivos utilizados en el montaje de cada técnica, en términos de costos económicos la qPCR sonda TaqMan conlleva un gasto adicional debido a la necesidad de la sonda como reactivo extra, por lo que comparada con la qPCR Sybr Green, la qPCR sonda TaqMan es 27% más costosa. Con respecto al costo por muestra analizada se obtuvo un valor de 25.189 \$ pesos colombianos para qPCR sonda Taqman, y de 6.086 \$ pesos colombianos para qPCR Sybr Green, costos basados netamente en reactivos utilizados y no se incluye otros gastos como equipos, personal especializado ni materiales de laboratorio.

Por otro lado en cuanto a la facilidad del montaje, las dos técnicas requieren experticia en el pipeteo, ya que en los dos montajes se manejaron volúmenes reducidos, representando una importante fuente de error, asimismo es importante destacar que el almacenamiento de los reactivos representó un reto en la investigación debido a que requiere un estricto control, especialmente con la sonda TaqMan, la cual requiere precisas condiciones en cuanto a temperatura y luz para preservar su funcionalidad.

4.4.3 Análisis estadístico

En el análisis estadístico tipo T-Wilcoxon (**Figura 19**) se observa la comparación de la distribución de los treinta datos de Cq obtenidos para cada una de las dos técnicas, de este análisis se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las dos técnicas de biología molecular comparadas donde las puntuaciones de qPCR Sybr Green y qPCR Sonda TaqMan obtuvieron un valor $p = 0,7676$.

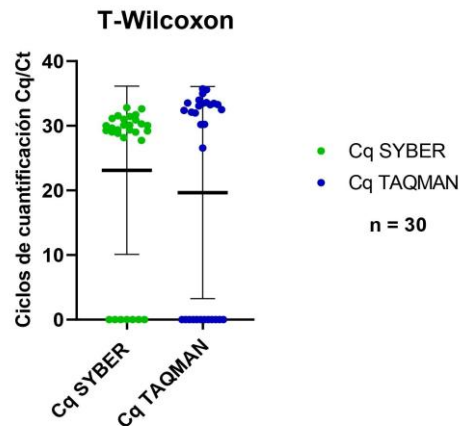


Figura 19. Resultados de análisis estadístico T-Wilcoxon

Gráfico de cajas que compara la distribución de los ciclos de cuantificación de Cq (eje Y) obtenidos para las 30 muestras utilizando los dos métodos de biología molecular (eje X), para el método Sybr Green se muestran los puntos verdes, para el método TaqMan se muestran los puntos azules, la línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana, los bigotes se extienden hasta rangos razonables.

5. DISCUSIÓN

A pesar de las estrategias de control implementadas, como la iniciativa ETMI PLUS, la sífilis congénita, causada por *Treponema pallidum* sigue siendo un problema de salud pública en Colombia (47). El manejo clínico de la SC se ve complicado por factores como las barreras en el acceso a la salud, pruebas convencionales de baja sensibilidad y especificidad y un diagnóstico tardío, factores que contribuyen al aumento de la morbimortalidad neonatal. Estas limitaciones resaltan la necesidad urgente de implementar nuevas herramientas diagnósticas para una detección temprana y precisa. En este contexto, las técnicas de biología molecular, debido a su alta eficiencia y confiabilidad, emergen como opciones prometedoras. En este estudio, se compararon la eficiencia, sensibilidad analíticas y especificidad in silico de las técnicas de qPCR Sybr Green y qPCR TaqMan, utilizando como dianas moleculares los genes *polA* y *TpN47*, con el objetivo de identificar cuál de ellas ofrece mayores beneficios para el diagnóstico de sífilis congénita y su posible inclusión en el algoritmo nacional.

En esta investigación se analizó la presencia de *Treponema pallidum* en muestras neonatales, las cuales han mostrado alta sensibilidad (67%-94%) en pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de sífilis congénita, comparadas con la prueba de infectividad en conejo (RIT). Otras muestras recomendadas son el líquido amniótico (75%-100% de sensibilidad) y el líquido cefalorraquídeo (60%-75%). Un estudio de Ian Michelow (2002) reportó una sensibilidad del 94% para PCR en suero de neonatos, con una concordancia estadística de $K=0.76$ con la prueba de infectividad de conejo. Aunque las muestras de suero neonatal son eficaces, presentan el reto de mejorar la pureza del ADN obtenido (61).

Los dos genes diana, *polA* y *TpN47* han mostrado resultados similares en términos de sensibilidad y especificidad. Un metaanálisis de Angele Ageron et al. (2015) también concluyó que no hubo diferencias significativas entre los dos métodos de PCR en tiempo real. El metaanálisis reportó una sensibilidad de 79.8% para *TpN47*-Tp-PCR y 71.4% para *polA*-Tp-PCR, y una especificidad de 95.3% y 93.7%, respectivamente. Los autores sugieren que ambos métodos tienen precisión similar y pueden ser utilizados de manera intercambiable (62). Además, es importante resaltar que

el análisis de resultados debe hacerse teniendo en cuenta las características de cada gen, en cuanto a susceptibilidad de mutaciones y su especificidad en las subespecies del patógeno, siendo así que los genes *polA* y *TpN47* son altamente conservados en *T. pallidum* (73,74) y si bien está presente en varias subespecies, con el diseño de primers se busca la amplificación de zonas específicas para la subespecie deseada (72).

En este estudio, la técnica qPCR Sybr Green se desarrolló siguiendo el protocolo adaptado de una qPCR multiplex asesorado por la Dra. Addy Cecilia Helguera Repetto y basado en las especificaciones de Acurris qMAX GREEN No Rox qPCR MIX PR 2000-N. Por otro lado, la técnica qPCR sonda TaqMan se realizó conforme al protocolo del semillero REMA, con modificaciones en temperaturas y volúmenes de reactivos, basándose en nuevos primers diseñados bajo las recomendaciones de la Dra. Helguera Repetto, los cuales mejoran el rendimiento (Anexo 3), y se ajustó la concentración de una nueva sonda, pues debido a problemas de almacenamiento se tuvo que adquirir este reactivo de otra casa comercial. Asimismo, para la evaluación de las dos técnicas se utilizaron 2 controles con condiciones de obtención diferentes (**Tabla 2**), es de resaltar que el control utilizado para *TpN47* fue diseñado hace más de 5 años por lo que contaba con limitaciones técnicas. Con la continuidad del presente estudio se espera obtener un control para el gen *TpN47* a partir de clonación de DNA del gen en un vector bacteriano, de la misma forma en la que se realizó para gen *polA*, lo que puede contribuir a la mejora en la estandarización de la qPCR TaqMan.

El montaje de qPCR Sybr Green y qPCR TaqMan mostró buena linealidad (R^2 de 0.97 y 0.99) y altas eficiencias (116.5% y 168.65%, respectivamente), superiores a los resultados reportados por Barbosa y González (2019) sin embargo es de resaltar que el R^2 de qPCR Sybr Green si bien no cumple con el valor de linealidad requerido para la aceptación del mismo como predictor de comportamiento lineal, si presenta una linealidad cercana al 0.970 la cual denota un patrón tendencial. Por otro lado las eficiencias obtenidas de las dos reacciones sobrepasan los límites recomendados (57). Estos resultados suelen estar relacionados a errores de pipeteo en las diluciones seriadas y en la amplificación de productos inespecíficos como dímeros de primers, sin embargo, en este caso se comprobó la inexistencia de los mismos por la curva melting, así mismo también pueden deberse a la presencia de inhibidores, mostrando pendientes menores y eficiencias

aumentadas (56). Finalmente, estos resultados sugieren la necesidad de algunos ajustes técnicos para la mejora de estos valores, incluyendo la optimización de los controles y el fortalecimiento de la practica en el pipeteo del personal.

En cuanto a las sensibilidades analíticas alcanzadas, la técnica qPCR sonda TaqMan mostró mejor sensibilidad, detectando hasta 0.01 fg/uL de ADN, mientras que qPCR Sybr Green requiere una mayor cantidad de ADN (1000 fg/uL o 10 pg) para su detección. Sin embargo, la sensibilidad de qPCR Sybr Green fue mejor que la reportada por Pinilla et al. (2015) (460 pg), lo que podría explicarse por la diferencia en el tipo de muestra utilizada.

El análisis de la curva melting para la técnica de qPCR Sybr Green demuestra una amplificación específica y la usencia de dímeros de primers y uniones inespecíficas, que pudieran interferir en el análisis de los resultados.

El análisis bioinformático realizado para los primers y sonda utilizados en los ensayos demostró alta fidelidad de unión a su respectivo blanco y por el contario descarto la unión inespecífica a otros objetivos. Para evaluar la especificidad de la prueba se recomienda hacer uso de cepas control de otros microorganismos.

Realizado el análisis de resultados de las muestras se identificó un comportamiento irregular observado tanto en los resultados serológicos como moleculares, de tal modo, se evidenció que una de las muestras presentó un falso negativo serológico, pues mostró positividad en ciclos de amplificación tempranos para ambas técnicas de biología molecular Sybr (27.73) TaqMan (26.57), esto puede estar asociado a un periodo de ventana serológica por el que el neonato estaría cursando al momento de la prueba serológica (65), en este contexto el neonato si presentaba infección sin embargo no fue detectada por la serología pero si por las técnicas moleculares.

Igualmente, de 3 muestras con patrón serológico reactivo con títulos ≥ 8 diluciones solo 1 muestra con título serológico de 16 diluciones presentó positividad en ambas técnicas de biología molecular Sybr Ct (28.83) TaqMan Ct (30.23), las otras 2 muestras con título de 8 diluciones solo presentaron positividad en la técnica de qPCR TaqMan. En estas 2 muestras pese a tener un título serológico relativamente alto, la concentración de material genético del patógeno era muy baja, ya que solo pudo ser identificado en Ct avanzados relativamente cercanos al Cut Off de la prueba qPCR

TaqMan. Esto refuerza la alta sensibilidad analítica para la detección que presenta esta prueba frente a la qPCR Sybr Green.

Ocho muestras (excluyendo 2 analizadas anteriormente) presentaron positividad para la técnica qPCR Sybr Green, de las cuales 6 son negativas para la técnica de qPCR TaqMan con Ct en rangos de 32,12- 35,6 y 2 negativas con Ct de 0,00. Se plantea entonces que en el caso de las 6 muestras negativas por qPCR TaqMan se deben considerar condiciones adicionales tales como la degradación de material genético de los eluidos por el tiempo prolongado entre la extracción y el montaje, inhibidores de la reacción, así como las condiciones de almacenamiento en las que las muestras/eluidos sufrieron procesos de congelación y descongelación pudiendo impactar en los resultados.

Las muestras que mostraron reactividad serológica en diluciones iniciales (2 y 4 diluciones), pero dieron resultados negativos en las pruebas moleculares (con ciclos cercanos al límite cut-off), como las muestras 1, 10, 11 y 20, fueron categorizadas como negativas. Se recomienda no descartar la posibilidad de infección y continuar con vigilancia estricta del caso, observando tanto la evolución de las pruebas serológicas como moleculares. Esto se debe a que la enfermedad podría estar en su fase inicial, lo que dificulta su detección, o bien a la posible reactividad cruzada por anticuerpos maternos.

En el análisis estadístico con la prueba de Wilcoxon para 30 muestras, se compararon los valores de Ct obtenidos con ambas técnicas moleculares. Sybr Green presentó una distribución entre Ct 29.00-31.00, y TaqMan, entre Ct 30.00-35.00. El valor de $p < 0,7676$ indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las pruebas, lo que sugiere que cada técnica tiene parámetros en común y puede ser analizada comparativamente.

Para evaluar la repetibilidad de las técnicas de biología molecular utilizadas, se calculó el coeficiente de variación (CV) a partir de los valores de Ct obtenidos en las 30 muestras procesadas con Sybr Green y TaqMan. Los resultados obtenidos fueron de 4.01% para Sybr Green y 8.64% para TaqMan, lo que indica una baja variabilidad en la dispersión de los datos en ambos casos. Estos valores se encuentran dentro de los rangos aceptables para técnicas cuantitativas en biología

molecular, donde un CV menor al 10% suele considerarse indicativo de una buena repetibilidad (66). Por lo tanto, se concluye que ambas metodologías presentan una alta consistencia en los resultados, siendo sus medias representativas y confiables para su uso en ensayos posteriores.

De acuerdo con los resultados obtenidos y discutidos en esta investigación, se destacan hallazgos relevantes para avanzar en el desarrollo de una prueba molecular eficiente para el diagnóstico de sífilis congénita. Primero, usar muestras neonatales representa una opción prometedora por su fácil y rápida obtención, lo que facilita su implementación en contextos clínicos. No obstante, su aplicación en técnicas moleculares plantea el reto de lograr una extracción eficiente y pura de ADN, ya que este debe estar libre de inhibidores que puedan interferir en la amplificación por PCR. Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian la necesidad de optimizar los métodos de extracción para mejorar la pureza del ADN y garantizar la efectividad de las reacciones moleculares. Esto abre una línea importante de trabajo hacia la mejora de los protocolos de procesamiento de este tipo de muestras.

Esta investigación presenta dos metodologías moleculares detalladas, incluyendo el proceso y los insumos utilizados, que pueden servir como base sólida para futuros ensayos. Ambas técnicas demostraron potencial para la detección de *Treponema pallidum* en muestras neonatales, incluso a partir de diferentes concentraciones de ADN. Los resultados obtenidos sugieren que, con ajustes pertinentes, estas metodologías podrían optimizarse aún más. Se recomienda continuar con el desarrollo y perfeccionamiento de estas técnicas, considerando las observaciones descritas en el **Anexo 6**, con el fin de fortalecer su aplicabilidad en estudios diagnósticos.

6. CONCLUSIONES

En búsqueda de mejorar el diagnóstico oportuno de la sífilis congénita, las técnicas de biología molecular surgen como opciones prometedoras para la detección directa del patógeno a partir de diferentes tipos de muestras, contando con altos niveles de sensibilidad y especificidad analítica, esto supone una mejora en el algoritmo diagnóstico de la enfermedad, contribuyendo al diagnóstico y tratamiento oportuno de los neonatos en el país.

Respecto al 1 objetivo planteado en el presente trabajo, las muestras neonatales resultan ser una opción favorable en el diagnóstico de la sífilis congénita en cuanto a la facilidad y rapidez en su recolección, sin embargo para ser usadas en las técnicas moleculares requieren de un proceso de extracción exitoso, que resulte en la obtención de ADN puro, este proceso de extracción se considera un punto crítico para favorecer la eficiencia de la amplificación, el protocolo de extracción usado en esta investigación permitió la obtención de ADN desde muestras neonatales sin embargo se registraron deficientes niveles de pureza, por este motivo se manifiesta la necesidad de optimizar los métodos de extracción para este tipo de muestras y características técnicas de cada laboratorio.

Asociado al 2 objetivo del presente trabajo, las evaluaciones realizadas para qPCR Sybr Green y qPCR sonda TaqMan con los protocolos propuestos, demandaron reiterados intentos, en los que se buscó optimizar las condiciones de reacción de acuerdo con los insumos disponibles, finalmente los resultados de estas evaluaciones y las pruebas con las muestras neonatales mostraron características prometedoras para su implementación en la detección del *Treponema pallidum* y se consideran como un aporte relevante para la optimización de estas pruebas diagnósticas.

Conforme a lo planteado en el objetivo 3 del presente trabajo, y los resultados obtenidos en las dos técnicas de qPCR implementadas, se observaron valores similares en sus características técnicas (Especificidad, linealidad, eficiencia, reproducibilidad), sin embargo, la técnica de qPCR sonda TaqMan presentó una mayor sensibilidad analítica, demostrando su valor diagnóstico en muestras

con baja cantidad de ADN y posiblemente en estadios tempranos de la enfermedad.

Con base en los protocolos e insumos implementados para la elaboración del presente trabajo, se observó que, en términos de costos, la prueba qPCR sonda TaqMan es 27% más costosa comparada con la técnica qPCR Sybr Green (**figura 18**), en parte, esta diferencia se debe a la necesidad de un reactivo adicional en la metodología TaqMan, el cual se demostró que aumenta la sensibilidad analítica en el diagnóstico de sífilis congénita.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez C. Comportamiento de la sífilis gestacional y la sífilis congénita en Colombia, semanas epidemiológicas 01 a 38 de 2019 a 2024. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. [Internet]. 2024. [cited 2025 Jan 30]. Available from: <https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/2024-boletin-epidemiologico-semana-40.pdf>
2. Sabogal.A, Bonilla. S. Protocolo de Vigilancia de Sífilis Gestacional y Congénita. Instituto Nacional de Salud [Internet]. 2022 Mar 18 [cited 2024 Mar 30];06. Available from:<https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/SIFILIS%20GESTACIONAL%20Y%20CONGENITA%20INFORME%20PRIMER%20SEMESTRE.pdf>
3. Luraghi S, Espiau G, Frick M, Cespedes M, et al. SÍFILIS CONGÉNITA. Hospital Universitari Vall d'Hebron - Universitat Autònoma de Barcelona [Internet]. 2015 Aug.[cited2024Apr5].Availablefrom:https://www.upiip.com/sites/upiip.com/files/Si%C3%ACfili s%20conge%C3%ACnita%20DEF_0.pdf
4. Satyaputra F, Hendry S, Braddick M, Sivabalan P, Norton R. The Laboratory Diagnosis of Syphilis. Journal of clinical microbiology [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2024 Apr 5];59(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33980644/>
5. Cooper JM, Sánchez PJ. Congenital syphilis. Seminars in Perinatology [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2024 Apr 5];42(3):176–84. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0146000518300119?via%3Dihub>
6. Durán-Rodríguez AT, Navarrete-Ospina J, Muñoz-Molina LC, Chavarro-Portillo B, Arenas-Moreno L, Pinilla-Bermúdez G. Detección molecular de sífilis gestacional y congénita. Infectio [Internet]. 2020 Jan 14 [cited 2024 Apr 1];24(1):15–9. Available from: https://revistainfectio.org/P_OJS/index.php/infectio/article/view/822
7. Theel ES, Katz SS, Pillay A. Molecular and Direct Detection Tests for *Treponema pallidum* Subspecies pallidum: A Review of the Literature, 1964-2017. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America [Internet]. 2020 June 24 [cited 2024 Apr 24];71(Suppl 1):S4–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32578865/>
8. M. Zafra Anta, V.M. García Nieto. Revista oficial de la sociedad Española de Pediatría extrahospitalaria y atención primaria. 2021 [cited 2024 May 16]. Sífilis congénitaPediatríaintegral.Availablefrom: <https://www.pediatríaintegral.es/publicacion-2021-09/enfermedades-pediatricas-que-han-pasado-a-la-historia-4-sifilis-congenita/>
9. Obladen M. Curse on two generations: A history of congenital syphilis. Neonatology [Internet]. 2013 [cited 2024 May 14];103(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23485862/>
10. Doménech GC. Filología y sífilis. Sobre el mal de simiente o mal de sement. Revista de Filología Española [Internet]. 1998 [cited 2024 May 14];78(3-4). Available from:

https://www.researchgate.net/publication/307741252_Filologia_y_sifilis_Sobre_el_mal_de_simiente_o_mal_de_sement/fulltext/5926e3d4aca27295a800b114/Filologia-y-sifilis-Sobre-el-mal-de-simiente-o-mal-de-sement.pdf

11. Peeling RW, Mabey D, Kamb ML, Chen XS, Radolf JD, Benzaken AS. Primer: Syphilis. Nature Reviews Disease Primers [Internet]. 2017 Oct 12 [cited 2024 Apr 18];3. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrdp201773>
12. World Health Organization. Mother-to-child transmission of syphilis [Internet]. 2020 [cited 2025 May 15]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/stis/prevention/mother-to-child-transmission-of-syphilis>
13. Barbosa M, González B. Detección de *Treponema Pallidum* subespecie Pallidum en muestras clínicas para el diagnóstico de sífilis congénita mediante la utilización de variantes de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. [Internet] [Tesis]. Bogotá. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2019. [Cited 2024 Apr 17]. Available from: <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/4765/FINAL%20SIFILIS.%20enero%2011%202019.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
14. Pinilla B. G, Chavarro P B, Moreno A. N, Navarrete O. J, Muñoz M. L. Determinación de los genes, 16S ADNr, polA, y TpN47, en la detección de *Treponema pallidum* subsp. pallidum para el diagnóstico de sífilis congénita. Nova [Internet]. 2015 [cited 2024 Apr 16];13(24). Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000200003
15. Tipple C, Hanna MOF, Hill S, Daniel J, Goldmeier D, McClure MO, et al. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. Sexually Transmitted Infections [Internet]. 2011 [cited 2024 Apr 16];87(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3252622/>
16. Riedel S, Hobden JA, Miller Steve, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. Jawetz, Melnick & Adelberg Microbiología Médica, 28e [Internet]. 28e ed. 2020. [Cited 24 Apr 17]. Available from: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2955§ionid=249740814>
17. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science [Internet]. 1998 [cited 2024 Apr 18];281(5375). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9665876/>
18. Paz Burgos LE. *Treponema pallidum*: estructura y antigenicidad. Universidad, Ciencia y Sociedad. Revistas Bolivianas [Internet]. 2010 [cited 2024 Apr 18];42. Available from: http://revistasbolivianas.umsa.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S8888-88882010000100008&lng=en&nrm=iso
19. Parker ML, Houston S, Pětrošová H, Lithgow K v., Hof R, Wetherell C, et al. The Structure of *Treponema pallidum* Tp0751 (Pallilysin) Reveals a Non-canonical Lipocalin Fold That Mediates Adhesion to Extracellular Matrix Components and Interactions with Host Cells. PLOS Pathogens [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2024 Apr 18];12(9):e1005919. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005919>
20. Brautigam CA, Deka RK, Liu WZ, Norgard M v. Insights into the potential function and membrane organization of the TP0435 (Tp17) lipoprotein from *Treponema pallidum* derived from structural and biophysical analyses. Protein Science [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2024 Apr 18];24(1):11–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.2576>

21. Noda R. AA, Blanco G. O, Espinosa L. Y, Rojas P. AA, Rodríguez G. I. Diversidad genética de *Treponema pallidum* en Cuba. Anales de la ACC [Internet]. 2021 [cited 2024 Apr 18];11(3). Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-01062021000300029
22. Arora N, Schuenemann VJ, Jäger G, Peltzer A, Seitz A, Herbig A, et al. Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster. Nature Microbiology [Internet]. 2016 [cited 2024 Apr 18];2. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016245>
23. Pětrošová H, Pospíšilová P, Strouhal M, Čejková D, Zbaníková M, Mikalová L, et al. Resequencing of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* Strains Nichols and SS14: Correction of Sequencing Errors Resulted in Increased Separation of Syphilis Treponeme Subclusters. PLoS ONE [Internet]. 2013 Sep 10 [cited 2024 Apr 18];8(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24058545/>
24. Guerra LO, Valdés FV. Diagnóstico molecular de la sífilis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2024 Mar 30];38:7–11. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-diagnostico-molecular-sifilis-S0213005X2030032X>
25. LaFond RE, Lukehart SA. Biological Basis for Syphilis. Clinical Microbiology Reviews [Internet]. 2006 Jan [cited 2024 Apr 24];19(1):29. Available from: [Biological Basis for Syphilis - PMC \(nih.gov\)](#)
26. Weigel LM, Radolf JD, Norgard M v. The 47-kDa major lipoprotein immunogen of *Treponema pallidum* is a penicillin-binding protein with carboxypeptidase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet]. 1994 Nov 11 [cited 2024 Apr 29];91(24):11611. Available from: [The 47-kDa major lipoprotein immunogen of Treponema pallidum is a penicillin-binding protein with carboxypeptidase activity. - PMC \(nih.gov\)](#)
27. Deka RK, Machius M, Norgard M v., Tomchick DR. Crystal structure of the 47-kDa lipoprotein of *Treponema pallidum* reveals a novel penicillin-binding protein. The Journal of biological chemistry [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2024 Apr 29];277(44):41857–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12196546/>
28. Setyarini W, Wiqoyah N, Nur A, Ansori M. Molecular Diagnostic Tools for *Treponema pallidum*. Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease [Internet]. 2023 Dec 7 [cited 2024 Apr 29];11(3):211-223-211–23. Available from: <https://e-journal.unair.ac.id/IJTID/article/view/44506>
29. Pětrošová H, Pospíšilová P, Strouhal M, Čejková D, Zbaníková M, Mikalová L, et al. Resequencing of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strains Nichols and SS14: correction of sequencing errors resulted in increased separation of syphilis treponeme subclusters. Plos one [Internet]. 2013 Sep 10 [cited 2025 Feb 12];8(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24058545/>
30. Liu H, Rodes B, Chen CY, Steiner B. Nuevas pruebas para la sífilis: diseño racional de un método de PCR para la detección de *Treponema pallidum* en muestras clínicas utilizando regiones únicas del gen de la ADN polimerasa I. J Clin Microbiol [Internet]. 2001; [cited 2025 Feb 13] 39(5):1941–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.5.1941-1946.2001>
31. Jovanović T, Ascenso C, Hazlett KRO, Sikkink R, Krebs C, Litwiller R, et al. Neelaredoxin, an iron-binding protein from the syphilis spirochete, *Treponema pallidum*, is a superoxide reductase.

43. Berman SM. Maternal syphilis: pathophysiology and treatment. Bulletin of the World Health Organization. 2004;82(6):433–8.[Internet]. 2004 [cited 2024 Apr 29];11(3):211-223-211–23. Available from: [433-438_03-008243.indd \(scielosp.org\)](https://scielosp.org/433-438_03-008243.indd)
44. Hospital universitario Vall d'Hebron. SÍFILIS CONGÉNITA [Internet]. 2015 [cited 2024 Apr29].Availablefrom:https://www.upiip.com/sites/upiip.com/files/Lues%20congènita%20UPIIP%202015_1.pdf
45. Laguado NF, García MJP. Enfoque global de la sífilis congénita. Rev médicas UIS [Internet].2011[citedel17demayode2024];24(2).Available:<https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistamedicasuis/article/view/2684>.
46. Porter S, Qureshi R, Benenson I. Understanding congenital syphilis. Infants and Young Children [Internet]. 2018 [cited 2024 Apr 29];31(4):287–96. Available from: https://journals.lww.com/iyjournal/fulltext/2018/10000/understanding_congenital_syphilis.4.aspx
47. Castellanos L, Massimo G, Kurtis H, Maeve B, Perez F, Roper A, et al. ETMI PLUS. Marco para la eliminación de la transmisión maternoinfantil del VIH, la sífilis, la hepatitis y la enfermedad de Chagas. Organización panamericana de la salud. 2017; [cited 2024Apr29].Availablefrom:<https://www.paho.org/es/documentos/etmi-plus-marco-para-eliminacion-transmision-maternoinfantil-vih-sifilis-hepatitis>
48. Sífilis [Internet].Sífilis. Organización mundial de la salud [cited 30 Apr 2024]. Available from : <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/syphilis>
49. Lucero Bonilla SM, et al. Informe de evento sífilis gestacional y sífilis congénita, Colombia, 2020. Instituto nacional de salud. [Internet]. 2020 [cited 2024 May 19]. Availablefrom:https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/SIF%C3%8DCLIS%20GESTACIONAL%20Y%20CONG%C3%89NITA_2020.pdf
50. Gpc-guía-corta-sífilis. 2014 [cited 2024 Apr 29]; Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/IETS/gpc-guia-corta-sifilis.pdf>
51. Ratnam Sam. The laboratory diagnosis of syphilis. The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology [Internet]. 2005 [cited 2024 Apr 29]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095002/>
52. Luo Y, Xie Y, Xiao Y. Laboratory Diagnostic Tools for Syphilis: Current Status and Future Prospects [Internet]. Vol. 10, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2021[cited2024Apr29].Availablefrom:<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.574806/full>
53. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica[Internet].2013[cited2024Apr8];2(5).Availablefrom:<https://www.medigraphic.com/pdfs/invidis/ir-2013/ir132d.pdf>
54. Ortega García M.^aV., Jiménez Mateo O., Sellek Cano R., Bassy Álvarez O., Granja Albarellos C., Cabria Ramos JC.. PCR cuantitativa en tiempo real para la Amplificación de ADN de Burkholderia mallei: comparación con el método molecular recomendado por la OIE. Sanid. Mil. [Internet]. 2017 Jun [cited 2024 Mayo 20] ; 73(2):85-

90. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1887-85712017000200085&lng=es. <https://dx.doi.org/10.4321/s1887-85712017000200002>.
55. Zeng H, Chan Y, Gao W, Leung WK, Watt RM. Diversity of *Treponema denticola* and Other Oral Treponeme Lineages in Subjects with Periodontitis and Gingivitis. *Microbiology Spectrum* [Internet]. 2021 Oct 31 [cited 2024 May 13];9(2). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/Spectrum.00701-21>
 56. Real-Time PCR Applications Guide. BIO RAD. [cited 2024 Nov 02]; Available from: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf
 57. Reagent Comparison Guide for Real Time PCR. BIO RAD [cited 2024 Nov 02]; Available from: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6252.pdf
 58. Carlos Andrés Castro Rojas, Claudia Patricia Tere Peña, María Mercedes Arias Cortés [y otros] -- Guía para el aseguramiento de la validez de las mediciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Bogotá DC, (Colombia): Instituto Nacional de Metrología, 2023. [cited 2024 Nov 02]; Available from: <https://inm.gov.co/wp-content/uploads/2023/11/Guia-de-PCR-final-1.pdf>
 59. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021 596:7873 [Internet]. 2021 Jul 15 [cited 2025 Feb 17];596(7873):583–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03819-2>
 60. Michelow IC, Wendel GD Jr, Norgard MV, Zeray F, Leos NK, Alsaadi R, et al. Central nervous system infection in congenital syphilis. *N Engl J Med* [Internet]. 2002; [cited 2025 Abr 03]; 346(23):1792–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa012684>
 61. Zhou C, Zhang X, Zhang W, Duan J, Zhao F. PCR detection for syphilis diagnosis: Status and prospects. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 2019; [cited 2025 Abr 03];33(5):e22890. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.22890>
 62. Gayet-Ageron A, Combescure C, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV. Comparison of diagnostic accuracy of PCR targeting the 47-kilodalton protein membrane gene of *Treponema pallidum* and PCR targeting the DNA polymerase I gene: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2015; [cited 2025 Abr 03]; 53(11):3522–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01619-15>
 63. Stephen Bustin, Jim Huggett. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification* [Internet], Volume 14, 2017, Pages 19-28, ISSN 2214-7535, Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
 64. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2015 Mar 1;3:9–16, Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
 65. Chávez Paula, Albornoz Javiera, Gutiérrez Marcela, Conca Natalia. Chancro palpebral como manifestación de sífilis congénita: comunicación de un caso. *Rev. chil. infectol.* [Internet]. 2024 Jun [citado 2025 Abr 19]; 41(3): 447-452. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182024000300447&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182024000300128>.
 66. Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in*

- Biotechnology [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2025 Apr 19];37(7):761–74. Available from: <https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S0167779918303421>
67. Seña AC, Matoga MM, Yang L, Lopez-Medina E, Aghakhanian F, Chen JS, et al. Clinical and genomic diversity of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* to inform vaccine research: an international, molecular epidemiology study. *Lancet Microbe* [Internet]. 2024; [cited 2025 May 16] 5(9):100871. Available from :[http://dx.doi.org/10.1016/S2666-5247\(24\)00087-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2666-5247(24)00087-9).
 68. Cifuentes-Cifuentes Y, Gómez-Aristizábal LS, Pinilla G, Cruz C, Navarrete J, Cifuentes-Cifuentes Y, et al. CONGENITAL SYPHILIS CONFIRMED BY PCR AS A RESULT OF TREATMENT FAILURE FOR SYPHILIS IN PREGNANCY. CASE REPORT. *Case reports* [Internet]. 2022 Aug 3 [cited 2025 May 24];8(1):51–62. Available from:http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2462-85222022000100051&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 69. Brodzka S, Kamiński P, Baszyński J, Mroczkowski S, Rektor K, Stanek E, et al. Optimized Protocol For DNA Extraction from Human Whole Blood. *Cellular Physiology and Biochemistry* [Internet]. 2025 [cited 2025 May 27];59(1):47–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40079913/>
 70. Invitrogen Corporation. PureLink™ Genomic DNA Mini Kit [Internet]. 2007 [cited 2025 May 27]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182001>
 71. Labmate. What is the Difference Between Repeatability and Reproducibility? Labmate Online [Internet]. [cited 2025 May 27]. Available from: <https://www.labmate-online.com/news/news-and-views/5/breaking-news/what-is-the-difference-between-repeatability-and-reproducibility/30638>.
 72. Liu H, Rodes B, Chen CY, Steiner B. Nuevas pruebas para la sífilis: diseño racional de un método de PCR para la detección de *Treponema pallidum* en muestras clínicas utilizando regiones únicas del gen de la ADN polimerasa I. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2001;39(5):1941–6. [cited 2025 May 27]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.5.1941-1946.2001>
 73. Wang C, Cheng Y, Liu B, Wang Y, Gong W, Qian Y, et al. Sensitive detection of *Treponema pallidum* DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. *Emerging Microbes & Infections* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2025 May 28];7(1). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1038/s41426-018-0085-2>
 74. Wang C, Zheng X, Guan Z, Zou D, Gu X, Lu H, et al. Quantified Detection of *Treponema pallidum* DNA by PCR Assays in Urine and Plasma of Syphilis Patients. *Microbiology Spectrum* [Internet]. 2022 Mar 21 [cited 2025 May 28];10(2). Available from: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/spectrum.01772-21?download=true>

8. ANEXOS

ANEXO 1

PROCOLO DE EXTRACCIÓN DNA MINI KIT PURELINK THERMOFISHER

1. Se utilizó una relación 1:1 de muestra y Buffer + PK
2. Se utilizaron 100 uL de muestra + 94 uL de Buffer + 6 uL de PK
3. Vortex 5 segundos
4. Incubar a 55° por 30 minutos (Mezclar cada 10 min)
5. Centrifugar 3 minutos a 10.000 RPM a temperatura ambiente
6. Transferir sobrenadante “agregar 200 uL de Buffer Lysis binding
7. Mezclar con vortex por 15 segundos
8. Agregar 200 uL de etanol al 100% a la muestra, mezclar bien hasta obtener una solución homogénea
9. Se transfiere la mezcla a la columna Purelink
10. Centrifugar 10.000 RPM x 1 minuto a temperatura ambiente
11. Descartar el líquido del tubo de colección
12. Lavar la columna con 500 uL de Wash Buffer 1
13. Centrifugar 10.000 RPM por 1 minuto a temperatura ambiente
14. Pasar la columna a un nuevo tubo Purelink
15. Lavar la columna con 500 uL de Wash Buffer 2
16. Centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente
17. Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo
18. Agregar 30 uL de Buffer de elución (Previamente calentado a 55C°)
19. Incubar a temperatura ambiente por un minuto
20. Centrifugar a 14.000 RPM por 3 minutos

21. Repetir el paso 18, 19, 20 (Tomar los mismos 30 uL del tubo)

22. Guardar las muestras a -20C°

ANEXO 2
PROTOCOLO qPCR CON Sybr Green PARA LA DETECCIÓN DEL GEN *polA* de
***TREPONEMA PALLIDUM*.**

1. Se preparará la máster mix de la reacción tomando en cuenta los siguientes datos:

	Concentración	Volumen para 1 reacción (uL)
M mix 2x	1 X	5
Primer F + Primer R (20 uM)	5 uM	0.4
H2O		2.6
Total		8

2. Se agregarán **2 uL** de la muestra a cada reacción correspondiente.

3. Se iniciará el montaje tomando en cuenta los siguientes datos para la programación del termociclador.

	CICLO 1	CICLO 2 (x 40)			CICLO 3
	Paso 1	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 1
Temperatura °C	95,0	95,0	56,0	72,0	95,0
Tiempo	5:00 min	15 seg	15 seg	15 seg	5 min

- **Especificaciones primers usados en qPCR Sybr Green *polA***

Primers Sybr Green	
Forward	5´TGATTGTGAAACGGATGGAT
Reverse	3´TTCCTGAAAGCAGATCGAAA
Concentración	20 Um
Volumen	50 uL
Tarjet	<i>polA</i>

ANEXO 3

PROTOCOLO qPCR CON SONTA TaqMan PARA LA DETECCIÓN DEL GEN Tpn47 DE *TREPONEMA PALLIDUM*.

1. Se preparará la máster mix de la reacción tomando en cuenta los siguientes datos:

	Volumen para 1 reacción (uL)	Volumen para 5 reacciones (uL)	Volumen para 10 reacciones (uL)
M mix 2x (Applied Biosystems)	12,5	62.5	125
Primer F (5 pM)	0,35	1.75	3.5
Primer R (5 pM)	0,35	1.75	3.5
H2O	4,3	21.5	43
Sonda 5 pM	2,5	12.5	25
TOTAL	20	100	200

2. Agregar 20 uL de máster mix preparada en cada tubo + 5 uL de la muestra.
3. Se iniciará el montaje tomando en cuenta los siguientes datos para la programación del termociclador.

	CICLO 1	CICLO 2 (x45)		
	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura °C	95,0	95,0	56.5	72,0
Tiempo	10.0	0:15	0:30	0.20

- **Especificaciones primers y Sonda TaqMan usados en qPCR TaqMan TpN47**

Primers TaqmanMex	
Forward	5´TTCATGAGGAACCGCAACTG
Reverse	3´TTCCTTCATGGTTGACAGCG
Concentración	100 pM
Volumen	260 uL
Tarjet	<i>TpN47</i>

Sonda Taqman	
Secuencia	5´CCGTGAACCTTTACGTTTCGT
G:C	50%
Concentración	100 pM
Volumen	280 uL
Tm	59.8 °C
Modificación	5´FAM - 3´BHQ
Tarjet	<i>TpN47</i>

ANEXO 4

PROTOCOLO PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA VECTOR CON EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE *polA*

1. Filtrar 1 ml de ampicilina con trompo de 0.5 mm (Ampicilina de 1 gramo en 5 ml)
2. Cálculos de crio preservación de viales 100 ml BHI + 100 uL ampicilina
3. Crecimiento de la bacteria recombinada a 37 C° sin agitación durante 24 horas
4. Se realizan alícuotas en crio tubos de 1.5 ml para crio preservación.
5. Se preparan 20 ml de solución de crio preservación así [10 ml glicerol al 30% + 10 ml BHI + 5 uL de ampicilina]
6. Para crio preservación se utiliza relación 1:1 750 uL Solución congelación + 750 uL suspensión bacteriana.
7. Guardar en crio viales de 1.5 ml a -70 C°

ANEXO 5

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE polA

1. Centrifugar la muestra a 14.000 rpm por 30 segundos
2. Decantar sobrenadante y re suspender pellet con 100 uL de solución GTE
3. Adicionar 200 uL de solución lisis alcalina y mezclar suavemente por inversión
4. Dejar reposar en hielo durante 5 minutos
5. Añadir 150 uL de solución acetato de potasio, mezclar suavemente y dejar reposar 5 minutos en hielo
6. Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos
7. Transferir 400 uL de sobrenadante a nuevo tubo eppendorf
8. Adicionar al sobrenadante 400 uL de fenol saturado: cloroformo proporción 1:1 (2 ml fenol saturado + 2 ml cloroformo) centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos.
9. Separar fase acuosa (superior) en nuevo tubo eppendorf
10. Adicionar 1 ml de etanol o isopropanol absoluto
11. Mezclar por inversión varias veces, dejar reposar en hielo durante 10 minutos (Precipitación del DNA)
12. Centrifugar en frío 4 C° a 14.000 rpm durante 20 minutos (compactación del DNA)
13. Decantar
14. Lavar pellet con 500 uL de etanol al 70%
15. Centrifugar a 14.000 rpm durante 15 minutos, posteriormente decantar y dejar secar a temperatura ambiente.
16. Re suspender la pastilla seca en 50 uL de agua destilada o TE
17. Etiquetar y almacenar a -20 C°

ANEXO 6

LIMITACIONES, PROSPECTIVAS Y OBSERVACIONES

Limitaciones

Para la consecución del presente trabajo se realizaron diversas modificaciones a los protocolos estandarizados tanto en qPCR Sybr green como en qPCR sonda TaqMan, ya que se presentaron diversas limitaciones a la hora de la aplicación de los protocolos, debido a cambios imprevistos de reactivos, lo cual generó la necesidad de la optimización de los mismos en nuevos equipos, nuevos reactivos y nuevos volúmenes y concentraciones.

Para el presente trabajo se sortearon diversas dificultades, considerando una de las más importantes, la obtención del material genético control, en el caso de qPCR Sybr green polA el control se obtuvo desde México a partir de la clonación de un plásmido en *E.coli*, no obstante, el transporte de dicho control presentó dificultades, prolongándose los tiempos de procesamiento de las muestras. Por otro lado, en el caso de qPCR sonda TaqMan TpN47 el control fue más complejo obtenerlo, ya que en un inicio se esperaba contar con la clonación de un plásmido en *E.coli*, no obstante, la obtención del gen dado el diseño de primers, no permitía la amplificación del amplicon buscado. Por ende, recurrimos a buscar nuevos controles del gen, partiendo de muestras de suero de pacientes con sífilis, los cuales presentaban reactividad serológica VDRL-RPR, sin embargo, las muestras presentaban muy baja concentración para conseguir el mínimo de 100ng/uL para las curvas de calibración de la prueba. Como último recurso se consiguió el control final, el cual fue eluido de testículo de conejo infectado con *T.pallidum* cepa Nichols, el cual se encontraba en concentración óptima, para el diseño de la curva de calibración de la prueba.

Con base en lo anterior es de destacar que el presente trabajo buscó comparar el comportamiento de dos técnicas de biología molecular en el diagnóstico de SC, no obstante, es de resaltar que ambas técnicas presentan dianas moleculares distintas, lo cual puede conferir variación a los resultados obtenidos a partir de estas, por ende, se puede generar una nueva perspectiva de análisis de resultados, con base en las dianas moleculares.

Prospectiva

Se espera que el presente trabajo sirva como base conceptual y experimental a futuras investigaciones, para la estandarización de una técnica molecular que permita diagnosticar la SC de forma temprana. Es por esto que se plantean los siguientes puntos a tener en cuenta.

1. El diseño de primers es de vital importancia, para la amplificación de los genes dianas del patógeno. En el caso de *polA* si bien es un gen altamente conservado del patógeno, por ser su DNA polimerasa, está presente en varias subespecies del patógeno, al ser su mecanismo de replicación. No obstante, se podría implementar un mejor diseño de primers, para regiones altamente conservadas del mismo gen, que se encuentren asociadas únicamente a la subespecie *pallidum* para mayor especificidad.
2. Con la presente investigación también se espera la llegada de un control para TpN47 proveniente de la clonación de plásmidos en vectores bacterianos, los cuales permitirán obtener grandes concentraciones del gen, teniendo mayor acceso a este tipo de controles y por ende a la celeridad en la estandarización de una prueba molecular para el diagnóstico de SC.
3. Si bien en este trabajo se planteó la repetibilidad como medición de exactitud para el ensayo a partir de 1 analista, con el mismo equipo y mismos reactivos, pues se plantea a futuro la evaluación de la reproducibilidad de la prueba, la cual permitirá determinar si esta se podrá estandarizar en diversos centros diagnósticos, con diversos analistas y diversos equipos o reactivos.
4. En este estudio se realizó un análisis bioinformático de los primers y sonda usados para verificar su especificidad de unión al blanco deseado, representando un análisis *in silico* de lo que podría ser la especificidad técnica de la sonda, sin embargo, surge la necesidad de evaluar la especificidad de las técnicas por medio de un ensayo *in vivo* con el uso de cepas de otros microorganismos relacionados clínicamente con la sífilis.

Observaciones

Para la validación de pruebas de biología molecular se deben abarcar múltiples variables, las cuales

pueden afectar los resultados finales de la prueba, de esta manera se presentan algunas observaciones o recomendaciones a tener en cuenta al momento de evaluar una prueba qPCR.

1. Se deben realizar múltiples repeticiones de un ensayo en las mismas condiciones, para establecer un comportamiento de la prueba. En el caso del presente estudio se realizaron múltiples montajes de las curvas de calibración de ambas técnicas de biología molecular, pero solo 2 triplicados para la validación del método, asociado a los recursos y la cantidad de muestra disponible.

2. En el caso de las muestras que dieron Ct cercanos a la zona de Cut Off de las pruebas, se recomienda realizar un seguimiento a los pacientes por medio de pruebas de biología molecular, ya que, si bien las pruebas serológicas pueden generar falsos positivos/negativos por la inespecificidad de estas, las pruebas moleculares podrán arrojar mejores resultados al presentar mayor concentración del patógeno en el paciente en estudio.

3. Las muestras a trabajar en diagnóstico molecular, deben contar con fases de la calidad analítica, como etapas preanalíticas, en donde sea un personal idóneo quien obtenga las mismas, etapa analítica en donde se debe contar con cadena de frío, almacenamiento a -20 C° y en la medida de lo posible, ser extraídas lo más pronto posible, para evitar posible degradación del material genético.

4. Los kits de extracción de material genético cuentan con un protocolo de casa comercial, este debe ser adaptado a las necesidades del instituto que implementará y/o validará la prueba de biología molecular.

5. Las muestras extraídas deberán presentar una normalización de la concentración del material genético a trabajar, estableciendo estas concentraciones con base en la experimentación. Con base en el presente trabajo se recomienda normalizar en un rango de 50 ng/uL - 100 ng/uL.

6. Los reactivos a utilizar tanto en el proceso de extracción como en la ejecución de la prueba qPCR deben encontrarse debidamente almacenados según indicaciones de casa comercial, así como no exceder las fechas de vencimiento.

7. Los protocolos de termo ciclado deben ser ajustados con base en las especificaciones de casa comercial, pero también basándose en el tamaño de los amplicones a trabajar. En el presente trabajo se utilizaron entre 40-45 ciclos de amplificación asociado a un tamaño de amplicón oscilante entre 70-90 pb.